

Endogene und therapeutische Liganden von  
Mustererkennungsrezeptoren bei der immunologischen  
Tumor-Wirt-Interaktion

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Clarissa Anni Wild

aus Offenbach

im Juni 2012

---

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Forschungsabteilung der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Essen der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Sven Brandau

2. Gutachter: Prof. Dr. Karl Lang

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Shirley Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2012

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1	Mustererkennungsrezeptoren und ihre exogenen Liganden .....	8
1.1.1	Entdeckung der Mustererkennungsrezeptoren .....	8
1.1.2	Rezeptorfamilien.....	9
1.2	Zelltod und endogene Liganden von Mustererkennungsrezeptoren.....	12
1.3	Tumorimmunologie.....	14
1.3.1	Tumor-Immun-Escape-Mechanismen .....	15
1.3.1.1	Erkennung vermeiden, Immunsystem hemmen.....	15
1.3.1.2	Regulatorische T-Zellen .....	17
1.3.2	Defizitärer Immunstatus bei Kopf-/Halstumorpateinten .....	19
1.4	Immuntherapie .....	21
1.4.1	Grundlagen und Meilensteine der Immuntherapie .....	21
1.4.2	Immuntherapie bei Kopf-/Halstumoren .....	24
1.4.3	Imiquimod in der immunologischen Tumor-Wirt Interaktion .....	25
1.4.4	Poly(I:C) in der immunologischen Tumor-Wirt-Interaktion.....	27
1.4.5	HMGB1 in der immunologischen Tumor-Wirt-Interaktion.....	29
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	31
<b>2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>34</b>
2.1	Chemikalien .....	34
2.2	Puffer und Lösungen .....	35
2.3	Zellkulturmaterialien .....	36
2.4	Zytokine und Stimulanzen.....	36
2.5	Zelllinien.....	37
2.6	Geräte und andere Materialien .....	37
2.7	Antikörper .....	38
2.8	Patientenmaterial .....	40
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>41</b>
3.1	Immunologisch-zelluläre Methoden.....	41

## Inhaltsverzeichnis

3.1.1	Zellkultur .....	41
3.1.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	41
3.1.1.2	Kultivierung und Passagierung von Zelllinien .....	41
3.1.1.3	Zellzahlbestimmung mit dem Casy-Counter .....	41
3.1.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	42
3.1.1.5	Herstellung von NCS .....	42
3.1.1.6	Stimulation von FaDu-Zellen .....	42
3.1.1.7	Zellzahlmessung mittels MTT .....	43
3.1.2	Isolation und Behandlung humaner Immunzellen .....	44
3.1.2.1	Dichtezentrifugation von peripherem Blut .....	44
3.1.2.2	Aufreinigung mittels MACS-Technologie .....	44
3.1.2.3	T-Zellstimulation und -proliferation .....	45
3.1.2.4	Leukozytenisolation aus Tumorgewebe .....	46
3.1.2.5	In vitro Generierung von Th1-Zellen .....	47
3.1.3	Durchflusszytometrie .....	47
3.1.3.1	Oberflächenfärbung .....	48
3.1.3.2	Intrazelluläre Färbung .....	48
3.1.3.3	Annexin-V/ 7-AAD-Färbung .....	48
3.1.3.4	CD107a Degranulationsmessung .....	49
3.1.4	ELISA .....	49
3.1.5	HEK blue I IFN $\alpha/\beta$ .....	50
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>51</b>
3.2.1	RNA Isolation und reverse Transkription .....	51
3.2.2	Semiquantitative PCR .....	51
3.2.3	Gelelektrophorese .....	52
<b>3.3</b>	<b>Histologische Methoden .....</b>	<b>52</b>
3.3.1	Einfrieren von Tumorgewebe und Herstellung von Gefrierschnitten .....	52
3.3.2	Hämatoxylin/Eosin (HE-) Färbung .....	52
3.3.3	Kolorimetrische Färbung .....	53
3.3.4	Fluoreszenzmikroskopie .....	54
<b>3.4</b>	<b>Tierversuche .....</b>	<b>55</b>
3.4.1	Versuchstiere .....	55
3.4.2	Therapieschema .....	55
<b>3.5</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Poly(I:C) und Imiquimod auf die immunologische Tumor-Wirt-Interaktion .....</b>	<b>57</b>
4.1.1	Gegenläufige Effekte von Poly(I:C) und Imiquimod auf die KHT-Zelllinie FaDu .....	57

## Inhaltsverzeichnis

4.1.1.1	Tumorzellzahl.....	57
4.1.1.2	Tumorzelltod .....	58
4.1.1.3	Zytokinausschüttung.....	59
4.1.1.4	MHC-Klasse-I-Expression .....	62
4.1.2	Unterschiedliche Immunaktivierung von Poly(I:C)- und Imiquimod-behandelten Tumorzellen .....	62
4.1.2.1	Hemmung der NK-Zell-Degranulation.....	63
4.1.2.2	Aktivierung von Monozyten durch Poly(I:C)-behandelte FaDu-Zellen.....	64
4.1.2.3	Förderung der Th1-Migration durch Poly(I:C)-Behandlung .....	66
4.1.3	In vivo Analyse der Poly(I:C)- und Imiquimod-Behandlung im Xenograft-Tumormausmodell.....	68
4.1.3.1	Induktion von Zelltod in vivo durch Poly(I:C) und Imiquimod .....	68
4.1.3.2	Nukleäre HMGB1-Lokalisation in vivo durch Imiquimod .....	70
4.1.3.3	Unveränderte CXCL-10-Expression im Tumor .....	71
4.1.3.4	Unveränderte Vaskularisierung in Tumoren .....	72
4.1.3.5	Regulation der MHC-I-Expression durch Poly(I:C)- und Imiquimod in vivo.....	73
<b>4.2</b>	<b>Einfluss des endogenen PRR-Liganden HMGB1 auf regulatorische T-Zellen .....</b>	<b>75</b>
4.2.1	HMGB1-Expression in Kopf-/Halstumoren .....	75
4.2.1.1	Erhöhte HMGB1-Expression im KHT-Gewebe.....	75
4.2.1.2	Erhöhte HMGB1-Expression im Serum von KHT-Patienten.....	76
4.2.1.3	HMGB1-Expression in nekrotischem Zellüberstand von Tumorzelllinien .....	77
4.2.2	Expression HMGB1-erkennender Rezeptoren auf T-Zellsubtypen .....	78
4.2.2.1	TLR4 und RAGE auf Tregs und Teffs von gesunden Spendern im Blut .....	78
4.2.2.2	Erhöhte TLR4-Expression auf Tregs und Teffs von KHT-Patienten .....	79
4.2.2.3	TLR4 und RAGE auf Treg und Teff im Tumorgewebe .....	80
4.2.3	HMGB1 als Chemoattraktans für Tregs .....	81
4.2.4	Hemmung der T-Zell-Proliferation durch HMGB1 .....	83
4.2.5	Förderung der suppressiven Wirkung von Tregs durch HMGB1 .....	85
4.2.6	Förderung der IL-10-Sekretion durch HMGB1 .....	86
4.2.7	RAGE-abhängige Modulation der Funktionen von Tregs durch HMGB1 .....	88
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion der Methoden.....</b>	<b>90</b>
5.1.1	Extrazelluläre und intrazelluläre Gabe von Poly(I:C) .....	90
5.1.2	Komplexe Kokultur aus Tumorzellen, Zelltrümmern und Immunzellen .....	90
5.1.3	Therapieschema im Mausmodell .....	92
5.1.4	HMGB1-Quelle.....	93
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>94</b>
5.2.1	Mustererkennungsrezeptoren auf Tumorzellen und Tregs.....	94
5.2.2	Treg-Hemmung in der Krebstherapie .....	96
5.2.3	TLR4: pro- oder antitumoral? .....	98

## Inhaltsverzeichnis

---

5.2.4	RAGE und HMGB1: pro- oder antitumoral? .....	100
5.2.5	Welche Rolle spielt das Stroma?.....	105
5.2.6	Einsatz von Imiquimod als Krebstherapeutikum und Adjuvans .....	105
5.2.7	Einsatz von Poly(I:C) als Krebstherapeutikum und Adjuvans .....	108
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>140</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>141</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>142</b>
11.1	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge .....	142
11.2	Lebenslauf .....	144
11.3	Eidstattliche Erklärung .....	145

---

*“Drugs can only repress symptoms: they cannot eradicate disease. The true remedy for all diseases is Nature’s remedy .... There is at bottom only one genuinely scientific treatment for all diseases, and that is to stimulate the phagocytes. Stimulate the phagocytes. Drugs are a delusion”.*

The Doctor’s Dilemma (Arzt am Scheideweg)1906

George Bernard Shaw

# 1 Einleitung

## 1.1 Mustererkennungsrezeptoren und ihre exogenen Liganden

### 1.1.1 Entdeckung der Mustererkennungsrezeptoren

Der Medizin-Nobelpreis ging 2011 an drei Immunologen, die mit ihrer Forschung das Wissen über Reaktionsmechanismen des angeborenen Immunsystems revolutioniert hatten. Das menschliche Immunsystem besteht aus zwei Kategorien: dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Die beiden Systeme sind eng miteinander verflochten. Lange Zeit galt das adaptive Immunsystem als das Wichtigere der beiden. Doch die Forschung von Hoffmann, Beutler und Steinman legte die Grundsteine für heutige Impfstoffe und innovative Therapien von chronischen Entzündungen und Krebs. Bevor Zellen des adaptiven Immunsystems mithilfe ihrer spezifischen Rezeptoren mit antigenpräsentierenden Zellen interagieren können, müssen diese Zellen zunächst pathogene Eindringlinge und potenzielle Schadstoffe identifiziert haben. Doch wie erkennt eine unspezifische Immunzelle die Gefahr? Selbst nachdem molekulare Grundstrukturen von Pathogenen (sog. PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) als Auslöser einer Immunantwort identifiziert waren, blieb diese Frage lange Zeit unbeantwortet. Heute weiß man, dass das angeborene Immunsystem Rezeptoren besitzt, welche genau diese Muster erkennen.

Die am längsten erforschte Rezeptorfamilie ist jene der Toll-like Rezeptoren (TLR). 1984 entdeckte die Entwicklungsbiologin Christiane Nüsslein-Volhard das Gen, welches für die dorso-ventrale Ausrichtung der *Drosophila melanogaster* Embryonen verantwortlich ist. Sie nannte es Toll-Gen (Anderson *et al.* 1985).

1989 stellte Charles A. Janeway als erster die Hypothese auf, dass es auf der Oberfläche von Wächterzellen Rezeptoren geben müsse, die PAMPs erkennen könnten (Janeway, Jr. 1989). Er nannte sie „Mustererkennungsrezeptoren“ (PRR, *pattern recognition receptors*). Da PAMPs ausschließlich auf Pathogenen zu finden wären, würden PRRs zwischen „eigen“ und „fremd“ unterscheiden können. 1996 konnte diese Hypothese von Jules Hoffmann bestätigt werden. Er entdeckte, dass Fruchtfliegen mit Mutationen im Toll-Gen weniger widerstandsfähig gegen Pilzinfektionen waren und weniger entzündliche Stoffe bildeten (Lemaitre *et al.* 1996). Toll-Rezeptoren wurden somit erstmals mit einer Immunantwort in Verbindung gebracht; zunächst in der adulten Fruchtfliege. Daraufhin identifizierte Janeway selbst das zum Toll-Rezeptor der *Drosophila* humane Homologon (Medzhitov *et al.* 1997).



Bruce Beutler konnte ein Jahr später beweisen, dass Mäuse mit einer *loss-of-function* Mutation im TLR4-Gen resistent gegen LPS-induzierten Schockzustand waren. Er identifizierte demnach als erster, dass PAMPs Liganden für Mustererkennungsrezeptoren sind, die eine angeborene Immunantwort initiieren (Poltorak *et al.* 1998). Der Name der Toll-like Rezeptoren war geboren. Eine wichtige Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort stellen dendritische Zellen (DC, *dendritic cells*) dar. Diese werden über Mustererkennungsrezeptoren aktiviert, nehmen Antigene auf, prozessieren diese und machen sie für Zellen des adaptiven Immunsystems sichtbar (Zanoni and Granucci 2010). Ralph Steinman erhielt den Nobelpreis für die Entdeckung der DCs im Jahre 1973 (Steinman and Cohn 1973).<sup>1</sup>

### 1.1.2 Rezeptorfamilien

Zu den großen Familien der Mustererkennungsrezeptoren gehören TLR, RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*)-like Rezeptoren (RLR), NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren (NLR) und *C-type lectin receptors* (CLR). Sie sind evolutionär gesehen hoch konserviert und sind in der Keimbahn kodiert (Kawai and Akira 2011).

TLRs sind Typ I Transmembranproteine ohne katalytische Aktivität. Beim Menschen sind bisher 10 verschiedene TLRs entdeckt. Sie bestehen aus einer Leucin-reichen Ektodomäne, die für die Liganden-Interaktion verantwortlich ist, aus einem transmembranären Teil, sowie der zytosolischen Toll-Interleukin-1 Rezeptor (TIR)-Domäne, die für die Weiterleitung des Signals zuständig ist. Welche Art von Signalweiterleitung ausgelöst wird, hängt von der Rekrutierung und Interaktion der Adapterproteine MyD88, TRIF, TIRAP und TRAM ab (Kawai and Akira 2008). Der am besten beschriebene Weg geht über Rekrutierung von MyD88. Bis auf TLR3 kann MyD88 mit allen TLRs und aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit auch mit Mitgliedern der IL-1 Rezeptorfamilie interagieren. MyD88 besitzt am C-terminus eine TIR-Domäne und am N-terminus eine Todesdomäne (*death domain*). Über letztere rekrutiert MyD88 die Serin/Threonin-Kinase IL-1R-assozierte Kinase (IRAK). Nach Phosphorylierung assoziiert IRAK mit TRAF6 und führt zur Aktivierung des JNK- oder NFκB-Signalwegs (Muzio *et al.* 1998). Daneben gibt es MyD88-unabhängige Signalwege. Der bekannteste läuft über das Adaptorprotein TRIF. Hinweise häufen sich, dass es je nach TLR-Stimulation spezifische Adaptorproteine gibt, die zu einer Liganden-spezifischen Antwort führen (Nishiya and Defranco 2004). So können TLR3 und TLR4 mit TRIF

---

<sup>1</sup> Janeway starb 2003 und kam somit nicht mehr für die Auszeichnung 2011 in Frage.

assoziiieren, was zu einer Aktivierung von NFkB und IRF3 führt. TIRAP hilft TLR2 und TLR4 bei der Interaktion mit MyD88 und TRAM ermöglicht die Wechselwirkung von TLR4 mit TRIF. Somit kann TLR4 als einziger der TLRs vier verschiedene Adaptorproteine rekrutieren und damit zwei verschiedene Signalwege anschalten.

Die TLRs unterscheiden sich des Weiteren in ihrer Lokalisation, was auch Rückschlüsse auf ihre Funktion zulässt. TLR1, 2, 4, 5 und 6 sind extrazelluläre Rezeptoren, die Membranbestandteile von Pathogenen erkennen (Kawai and Akira 2011) (s.h. Tabelle 1). TLR3, 7, 8 und 9 sind intrazellulär für die Erkennung von Nukleinsäuren verantwortlich (Kawai and Akira 2011) (s.h. Tabelle 1). Letztere sind in der Zellmembran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden und wandern auf Aktivierung hin zu Endosomen und Lysosomen (Latz *et al.* 2004; Nishiya *et al.* 2005). Das Vorkommen in definierten Kompartimenten ermöglicht gleichzeitig „eigen“ von „fremd“ zu unterscheiden, da z.B. auf der Zelloberfläche von Makrophagen ektopisch exprimierter TLR9 auch wirteigene DNA bindet (Barton *et al.* 2006). Doch die Beschränkung auf das Lumen intrazellulärer Vesikel lässt auf ein weiteres cytosolisches Alarmsystem schließen. RLRs, NLRs und CLRs detektieren zytosolische DNA und retrovirale Infektionen (Barbalat *et al.* 2011). Während TLRs v.a. in Immunzellen und speziellen nicht-Immunzellen zu finden sind, kommen cytosolische PRRs weitverbreitet in Gewebszellen vor (Kawai and Akira 2008).

Zur Familie der RLR-Helikasen gehören RIG-I, *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). RLRs finden sich in fast jeder Körperzelle, wo sie auf virale Infektion mit der Produktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen antworten (Yoneyama and Fujita 2008).

RIG-I kodiert für eine DExD/H box RNA Helikase (Yoneyama *et al.* 2004). Diese besitzt am N-Terminus eine in Reihe geschaltete *caspase recruitment domain* (CARD) als Effektdomäne. Über diese interagiert der Rezeptor mit anderen CARD-enthaltenden Proteinen. Seine Tätigkeit wird durch eine zentral angeordnete Helikase-Domäne mit ATPase Aktivität sowie durch eine c-terminale Repressor-Domäne (RD) reguliert (Saito *et al.* 2007). Eine RD konnte ebenfalls bei LGP2, nicht jedoch bei MDA5 nachgewiesen werden. Dafür haben MDA5 und RIG-I die Expression von CARD gemein. Wie die RNA-Bindung von statten geht ist weitgehend unbekannt, da bisher weder RIG-I/RNA-Komplexe detektiert, noch RNA-bindende Motive in der Helikase nachgewiesen werden konnten.

Auch der Multiliganden-Rezeptor RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) muss an dieser Stelle vorgestellt werden. Er gehört in die Familie der Immunglobulin-

Superfamilie. 1995 wurde er als Bindungspartner für ein endogenes Gefahrenmolekül (s.a. Kapitel 1.4.5.) entdeckt und zählt somit auch zu den PRRs (Hori *et al.* 1995; Schmidt *et al.* 2000; Sims *et al.* 2010; Xie *et al.* 2008). RAGE ist ein Typ I transmembranärer Rezeptor, der aus einem kurzen cytoplasmatischen Schwanz, einer einzigen transmembranären Domäne und aus den drei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen V, C1 und C2 besteht (Koch *et al.* 2010). V und C1 bilden hierbei eine von C2 unabhängige Einheit, die für die Ligandenbindung zuständig ist (Koch *et al.* 2010). Bei Aktivierung rekrutiert RAGE ERK-1/-2 (*extracellular signal-regulated kinase-1 and -2*), was zur Aktivierung der NFkB- und MAP-Kinase-Signalwege führt (Ishihara *et al.* 2003). RAGE besitzt zahlreiche Liganden und ist in vielen pathologischen Geschehen involviert wie z.B. über AGE-Bindung bei Diabetes und amyloid- $\beta$ -Bindung bei Alzheimer (Fritz 2011). Der Rezeptor ist stark im Lungengewebe, und schwächer auf Endothelzellen, Neutrophilen, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, DCs und Neuronen exprimiert (Sims *et al.* 2010).

Tabelle 1 veranschaulicht die unterschiedlichen PRRs mit ihren exogenen, synthetischen und endogenen Liganden und hebt diejenigen hervor, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

**Tab. 1.1: Mustererkennungsrezeptoren mit ihren exogenen, endogenen und synthetischen Liganden** (Barbalat *et al.* 2011;Gnjatic *et al.* 2010;Kawai and Akira 2011;Rock and Kono 2008).

PRRs	PAMP		DAMP		Synthetischer Ligand
	Name	Ursprung	Name	Freisetzung	
TLR1/2	Triacyl-Lipopeptide	Bakterium			Pam3Cys
TLR2	Lipoproteine, Peptidoglykan	(gram+) Bakterium	<b>HMGB1</b> , HSP60	Nekrose	MALP-2, Pam2Cys
	Zymosan, Mannose	Pilz	Harnsäure	Nekrose, Apoptose	
TLR3	dsRNA	Virus	humane RNA		<b>Poly(I:C)</b> , Poly(A:U)
TLR4	LPS	Bakterium	<b>HMGB1</b> , HSP60	Nekrose	
			Harnsäure	Nekrose, Apoptose	
			Defensine		
TLR5	Flagellin	Bakterium			
TLR6	Zymosan	Pilz			MALP-2, PamCys (+TLR2)
TLR7	ssRNA	Bakterium, Pilz, Virus	humane RNA		<b>Imiquimod (R-837)</b> , Resiquimod (R-848)
TLR8	ssRNA	Virus	humane RNA		Resiquimod, 3M-012
TLR9	unmethylierte CpG DNA	Bakterium, Pilz, Virus, Parasit	(methylierte) humane CpG DNA	Nekrose, Apoptose	CpG ODNs
TLR10	unbekannt	unbekannt			
RIG-I	kurze dsRNA	Virus			kurzes Poly(I:C), kurzes ss 5'PPP-RNA (ohne Cap)
MDA5	lange ds RNA	Virus			langes <b>Poly(I:C)</b>
RAGE			<b>HMGB1</b>	Nekrose	
			S100 Proteine	n.d.	
P1, P2X, P2Y			Adenosin, ATP	Nekrose	

## 1.2 Zelltod und endogene Liganden von Mustererkennungsrezeptoren

Janeway revolutionierte mit seiner Hypothese über PAMPs und PRRs das immunologische Verständnis. Diese Theorie erklärte jedoch nicht, warum es in pathogenfreien Situationen, wie Transplantatabstoßung, Ischämie-bedingter Verletzung, Autoimmunerkrankungen und Tumoren ebenfalls zu einem inflammatorischem Prozess kommt (Srikrishna and Freeze 2009). Matzinger lieferte hierfür mit ihrem *danger model* die Antwort (Matzinger 1994). Die Hauptaufgabe des Immunsystems sei es nicht zwischen fremd und eigen zu unterscheiden, sondern gegen Gefahren zu schützen, ob sie nun von außen oder innen kämen (Gallucci *et al.*

1999;Matzinger 1994). Dennoch gab es zu dieser Zeit keinen Beweis, welche Strukturen genau dafür verantwortlich waren. Man wusste, dass tote Zellen eine Immunantwort auslösen können und sogar als Adjuvans dienen können, um eine antigenspezifische CD4- und CD8-Antwort in Mäusen zu induzieren (Gallucci *et al.* 1999;Shi *et al.* 2000). Hierbei konnte gezeigt werden, dass DCs durch tote Zellen *in vitro* zur Reifung gebracht werden können (Gallucci *et al.* 1999). Inhibition der Proteinsynthese konnte die adjuvante Wirkung nicht verstärken (Shi *et al.* 2000). Zellen, die durch Einfrieren und Auftauen abgetötet wurden, wirkten hingegen immunogen (Gallucci *et al.* 1999;Shi *et al.* 2000). Diese beiden Tatsachen führten zu der Erkenntnis, dass die verantwortlichen Strukturen bereits vorhanden sein mussten.

Mittlerweile ist diese These bestätigt: in Folge von unphysiologischem Zelltod (oder bei bestimmten Stimulationen) werden Moleküle frei gesetzt, die üblicherweise intrazelluläre Aufgaben erfüllen, extrazellulär hingegen Schaden und Gefahr anzeigen. Aus diesem Grund werden sie Alarmine oder *Damage associated molecular pattern molecules* (DAMPs) genannt (Chen and Nunez 2010;Kono and Rock 2008;Rock and Kono 2008;Vabulas *et al.* 2002). Ihnen wird eine zentrale Rolle bei Gewebereparaturprozessen und steriler Inflammation zugesprochen (Bianchi 2007).

Lange Zeit unterschied die Fachwelt nur zwischen zwei Arten von Zelltod: tolerogener Apoptose und immunogener Nekrose. Man leitete sich diese Schlussfolgerung wie folgt her: Zelltod, der unter physiologischen Bedingungen zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase entstehe, dürfe zu keiner Immunantwort führen, da diese unnötig und sogar gewebeschädigend wäre (Green *et al.* 2009). Unkontrollierter Zelltod hingegen, der z.B. in Folge eines Traumas oder beim Krebswachstum auftritt, müsse eine Immunantwort mit nachfolgender Gewebsreparatur hervorrufen. Bei Apoptose bilden sich aus Abschnürungen der Zellmembranen die sog. *apoptotic bodies* (Galluzzi *et al.* 2007). In diesen ist der Zellinhalt festgehalten und quasi versteckt (*hidden self model*) (Kono and Rock 2008). Sie werden demnach „still“ phagozytiert und eliminiert (Meagher *et al.* 1992). Bei Nekrose hingegen verliert die Zellmembran ihre Integrität und der Zellinhalt, inklusive DAMPs, trifft auf die umliegenden Zellen. Demnach müsste Apoptose nicht immunogen, wenn nicht sogar tolerogen sein, Nekrose hingegen immunogen. Die erste Behauptung wird in zahlreichen Studien bewiesen, in denen die Injektion apoptotischer Zellen, die ein bestimmtes Antigen tragen, periphere Toleranz induzieren (Ferguson *et al.* 2002;Gao *et al.* 1998).

Mittlerweile jedoch liegt neben Seneszenz und Autophagie, auch immunogene/inflammatorische Apoptose als Zelltoddefinition vor (Green *et al.* 2009).

Ob es zu einer tolerogenen oder immunogenen Apoptose kommt, ist ein komplexer Prozess und von folgenden Faktoren abhängig: 1. der auslösende Faktor ist ausschlaggebend. So kann es patho-physiologisch durchaus sinnvoll sein, dass z.B. eine virusbefallene Zelle, die ein Apoptosesignal erhält eine Immunantwort initiieren kann (Hardwick 2001; Tesniere *et al.* 2008). Viruserkennende Rezeptoren wie TLR3, TLR7, RIG-I und MDA5, die Zelltod induzieren können, sollten zu einem inflammatorischem Prozess führen. Außerdem wurde gezeigt, dass Induktion von Apoptose durch ionisierende Strahlen oder Anthrazyklinen inflammatorisch wirken, durch Etoposide oder Mitomycin C hingegen nicht (Casares *et al.* 2005; Lorimore *et al.* 2001; Obeid *et al.* 2007). 2. Die Zellart spielt eine entscheidende Rolle. Apoptotische Tumorzellen können durchaus immunogen sein (Goldszmid *et al.* 2003; Kotera *et al.* 2001; Nowak *et al.* 2003). Apoptotische Lymphozyten hingegen induzieren eher Toleranz (Jiang *et al.* 2006; Sun *et al.* 2004). 3. Die Anwesenheit weiterer proinflammatorischer Moleküle wie Typ I IFN, PAMPs und DAMPs entscheiden über die Immunogenität des Zelltodes. Diese Erkenntnis war bereits in den 1960er Jahren vorhanden, ohne sich ihrer Bedeutung bewusst zu sein. Dresser zeigte, dass ein körperfremdes, hoch aufgereinigtes Protein keine Immunantwort auslöste, außer wenn es mit einer mikrobiellen Substanz gemischt war (DRESSER 1961). Noch dazu induzierte das Protein alleine eine Art Toleranz (DRESSER 1962). Früh-apoptotische Zellen können von Makrophagen phagozytiert werden, ohne proinflammatorische Zytokine freizusetzen (Kurosaka *et al.* 2003). Im Gegenteil, die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF $\beta$  und plättchenaktivierender Faktor kann eine Immunantwort sogar bewusst behindern (Fadok *et al.* 1998). Die Schlüsselfragen für eine erfolgreiche Tumorthherapie lauten also: Wie wird immunogener Tumorzelltod induziert? Mit welchen Adjuvantien wird eine optimale Immunantwort gegen Tumorzellen initiiert?

Im Folgenden soll zunächst jedoch die Bedeutung des Immunsystems in der Tumorphathogenese besprochen werden.

### 1.3 Tumورimmunologie

In dem Übersichtsartikel „Hallmarks of Cancer“ von Hanahan und Weinberg aus dem Jahr 2000 werden folgende Krebsmerkmale genannt: autarkes Wachstum, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Vermeiden von Apoptose, Induktion von Angiogenese, uneingeschränktes Replikationspotential und Gewebeinvasion mit Metastasierung (Hanahan and Weinberg 2000). Diese Eigenschaften erlangen Krebszellen über einen längeren Zeitraum

aufgrund der Akkumulation von Genmutationen. Im ganzen Artikel wird nicht mit einem Wort das Immunsystem erwähnt. 11 Jahre später sind sich die Autoren einig, dass für die Krebsentstehung nicht allein die entartete Zelle verantwortlich sei, sondern dass das umliegende Stroma, das sog. Tumormikromilieu, einen erheblichen Teil dazu beiträgt (Hanahan and Weinberg 2011). Zwei sich neu abzeichnende Merkmale werden genannt: Anpassung des Energiestoffwechsels und Verhinderung einer Immunantwort. Diese Theorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei immungeschwächten Patienten die Häufigkeit an Krebs zu erkranken um das Dreifache erhöht ist (Vajdic and van Leeuwen 2009). Nicht nur virusassoziierte Malignität, auch karzinogeninduzierte Tumore unterstehen der Immunüberwachung, wie mithilfe transgener Mäuse bewiesen werden konnte (Dunn *et al.* 2002; Teng *et al.* 2008). Welche Mechanismen und welche Zellen spielen dabei eine Rolle? Wie können diese Erkenntnisse die Krebstherapie verbessern?

### 1.3.1 Tumor-Immun-Escape-Mechanismen

Burnet formulierte 1957 als erstes das Dogma der immunologischen Toleranzentstehung, das bis heute besteht und die Probleme der Tumorummunologie beinhaltet: 1. Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems ist es den Körper gegen körperfremde Pathogene zu verteidigen. 2. Um dieses zu erfüllen ist die Immunantwort proinflammatorisch. 3. Da Körpereigenes nicht erkannt werden darf, werden neonatale „verbotene Klone“ aussortiert um Toleranz als negativen Regulationsprozess des Immunsystems aufrechtzuerhalten (BURNET 1957c). Doch was passiert, wenn Körpereigenes plötzlich pathogen wird? Damit eine körpereigene, maligne Zelle vom Immunsystem erkannt wird, muss sie immunogen sein bzw. werden (Vesely *et al.* 2011). Dies kann durch eine Veränderung der Oberflächenstrukturen und Antigenpräsentation geschehen, die krank von gesund differenziert (Vesely *et al.* 2011). Sobald eine Gewebszelle ihren vorgegebenen Differenzierungsweg verlässt, sollte sie vom Immunsystem detektiert und eliminiert werden. Da dies in bestimmten Fällen jedoch nicht funktioniert, muss die maligne Zelle Eigenschaften besitzen, durch die sie der Immunüberwachung entkommt oder diese gar aktiv hemmt (Schreiber *et al.* 2011). Diese werden im Folgenden genauer erläutert.

#### 1.3.1.1 Erkennung vermeiden, Immunsystem hemmen

Eine reduzierte Immunerkennung kann als Folge von verminderter Antigenpräsentation auftreten. Diese kann in drei Ursachen begründet liegen (Khong and Restifo 2002; Schreiber *et al.* 2011). Erstens kann die Expression der antigenpräsentierenden Moleküle MHC-I

verloren gegangen sein. Dies wurde in verschiedenen Tumorentitäten beobachtet, darunter Melanom, Kolonkarzinom, Prostataadenokarzinom und Larynxkarzinom (Algarra *et al.* 1997; Aptsiauri *et al.* 2007). Zweitens kann eine Mutation in der Antigenprozessierungsmaschinerie zum Verlust der Antigenpräsentation führen (Khong and Restifo 2002). In verschiedenen Tumorentitäten konnte ein Funktionsverlust der Transportproteine TAP-1 und TAP-2, sowie der Immunoproteasombestandteile LMP2 oder LMP7 gezeigt werden (Khong and Restifo 2002). Drittens kann es zu einem Verlust immunogener Antigene kommen. Über den zugrundeliegenden Mechanismus wird viel spekuliert. Tatsache ist, dass innerhalb des gleichen Individuums bestimmte Antigene während verschiedener Tumorstadien unterschiedlich stark exprimiert werden (Hofbauer *et al.* 1998). Auch reduziert sich die Expression eines Tumorantigens nach erfolgter Vakzinierung mit dem entsprechenden Peptid (Riker *et al.* 1999). Man vermutet, dass dies durch eine Art immunologischen Selektionsdruck geschieht (Dunn *et al.* 2002). Alle Mechanismen haben zur Folge, dass Tumorzellen der Erkennung und Lyse durch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (CTL, *cytotoxic T lymphocytes*) entgehen. Natürliche Killer- (NK-) Zellen stellen in diesem Zusammenhang eine Art *backup*-Rettung dar. MHC-I wirkt hemmend auf NK-Zellen. Die *Missing-Self Hypothesis* besagt, dass NK-Zellen genau dann aktiviert werden, wenn kein Signal über MHC-I vermittelt wird. Doch können auch NK-aktivierende Signale verloren gehen, wie das Abstoßen oder die Runterregulation von NKG2D-Liganden auf Tumorzellen zeigt (Champsaur and Lanier 2010).

Ein weiteres beobachtetes Phänomen, warum sich Tumore in einem immunkompetenten Wirt manifestieren können, besteht darin, dass in der Umgebung des Tumors ein immunsuppressives Zytokinmilieu vorherrscht. Dies wird v.a. von den Tumorzellen selbst generiert. So konnten hohe Mengen VEGF, IL-10, PGE<sub>2</sub> und TGFβ im Tumormilieu und Serum von Tumorpatienten gefunden werden (Vesely *et al.* 2011). Diese Zytokine waren häufig assoziiert mit mangelhafter DC-Differenzierung/Reifung (VEGF, IL-10), Makrophagenhemmung (PGE<sub>2</sub>), T-Zell- und NK-Zellhemmung (IL-10, TGFβ) sowie schlechter Überlebensprognose (VEGF, TGFβ) (Khong and Restifo 2002). Man kann davon ausgehen, dass noch ein großer Teil regulatorischer Moleküle unerforscht ist. Mit der Entdeckung der DAMPs und ihrer Rezeptoren, Signalwege und Zielzellen ist mit einem Schlag eine komplett neue Gruppe potentiell immunmodulierender Moleküle „entstanden“, deren Bedeutung für die Tumorimmunologie noch weitgehend unbekannt ist und intensiv erforscht wird. Da in einem Tumorherd ein großer Zell-*turn-over* mit gesteigerter Proliferation sowie Apoptose/Nekrose stattfindet, kann von einer hohen Konzentration an



DAMPs ausgegangen werden (Rock and Kono 2008). Verschiedene DAMPs und ihre Effekte auf Tumor- und Immunzellen werden im Kapitel 1.4.5 besprochen. Es stellt sich hierbei die Frage, ob bereits alle Facetten dieser recht neu entdeckten, diversen Klasse an Molekülen erforscht sind.

Nicht nur tumorale Zytokine tragen zur Immunhemmung bei. Auch suppressive Immunzellen wie regulatorische T-Zellen spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle.

### 1.3.1.2 Regulatorische T-Zellen

Periphere Toleranz gegenüber Autoantigenen wird nicht ausschließlich durch Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus gewährleistet. Immunhomöostase wird aktiv durch „suppressive“ Zellen, darunter regulatorische T-Zellen (Treg), aufrecht erhalten (Itoh *et al.* 1999).

Tregs können dem Kompartement der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen als auch dem der CD8<sup>+</sup> CTLs angehören und teilen sich weiter in verschiedene Untergruppen auf (Josefowicz *et al.* 2012). Da CD4<sup>+</sup> Tregs die größere der beiden Gruppen darstellt und sich die vorliegende Arbeit mit CD4<sup>+</sup> Tregs beschäftigt, wird im Folgenden nur auf diese Zellart eingegangen. Man unterscheidet zunächst zwischen naiven und induzierten Tregs. Naive (n) Tregs entstehen ohne spezifische Antigenstimulation im Thymus und können, wenn sie diesen verlassen haben ihre suppressive Aktivität voll entfalten (Josefowicz *et al.* 2012). Sie entsprechen in etwa 5-6% der zirkulierenden CD4<sup>+</sup> Zellen und sind gekennzeichnet durch hohe Expression der IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (CD25) (Baecher-Allan *et al.* 2001). Als Masterregulator für ihre Suppressivität wurde der Transkriptionsfaktor FoxP3 identifiziert, der in Mäusen ausschließlich in Tregs exprimiert ist, im Menschen jedoch nicht zu 100% Tregs zugesprochen werden kann (Hori *et al.* 2003). Leider konnte bisher für menschliche Zellen kein exklusiver Oberflächenmarker für Tregs identifiziert werden. Das Fehlen des Oberflächenmarkers CD127 (IL-7 Rezeptor  $\alpha$ -Kette) auf humanen Treg kann als weitere Identifizierungshilfe herangezogen werden (Liu *et al.* 2006b). Diese Treg-Klasse vermittelt v.a. eine zell-zellkontaktabhängige Suppression (Jonuleit *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2001). Die Aktivierung erfolgt antigenspezifisch über den T-Zell-Rezeptor (TCR, *T cell receptor*), die Suppression antigenunabhängig. Nach TCR-Stimulation erfolgt eine veränderte Expression an Oberflächenmolekülen, die für die suppressive Wirkung verantwortlich sind und auch tote sowie paraformaldehydfixierte Tregs suppressiv bleiben lässt (Jonuleit *et al.* 2002; Miyara *et al.* 2009). TGF $\beta$  konnte als suppressives oberflächengebundenes Molekül

identifiziert werden (Nakamura *et al.* 2001), scheint aber nicht exklusiv für die suppressive Wirkung verantwortlich zu sein (Piccirillo *et al.* 2002).

Im Gegensatz zu nTregs können auch in der Peripherie aus naiven T-Zellen durch entsprechendes Zytokinmilieu und Antigenstimulation induzierte (i) Tregs entstehen. Antigenstimulation mittels dendritischer Zellen in Gegenwart von TGFβ führt zur Induktion von Th3-Zellen, die selbst über TGFβ-Sekretion suppressiv wirken (Chen *et al.* 2003). Eine Bedeutung dieser Zellen wurde zunächst im Zusammenhang mit oraler Toleranz beschrieben. Hierbei entsteht v.a. in der Darmmukosa, wo hohe Konzentrationen an TGFβ vorherrschen, gegenüber mit der Nahrung aufgenommener Antigene dieser regulatorische T-Zellsubtyp (Weiner 2001). In Gegenwart hoher Konzentrationen an IL-10 hingegen entstehen aus naiven CD4<sup>+</sup> Zellen die sog. regulatorischen T-Zellen vom Typ 1 (Tr1), die selbst durch IL-10 und TGFβ-Sekretion suppressiv wirken (Groux *et al.* 1997).

Welche Rolle spielen Tregs bei der Immunsuppression während einer Tumorerkrankung?

Suppressiv wirkende Lymphozyten wurden erstmals in den frühen 1970er Jahren von Gershon *et al.* beschrieben (Gershon *et al.* 1972; Gershon and Kondo 1971). Schnell wurden diese Zellen mit Tumoren in Verbindung gebracht (Fujimoto *et al.* 1975; Gershon *et al.* 1974). Nur wenige Jahre später konnte im Mausmodell bewiesen werden, dass diese T-Zellen Effektor-T-Zellen (Teff) hemmten und eine Tumorabstoßung verhinderten (Berendt and North 1980; Kirkwood and Gershon 1974; North and Bursucker 1984). Seit 1999 im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass durch Depletion von Tregs mittels CD25-neutralisierender Antikörper Tumorstadium verhindert werden kann, nehmen Tregs einen festen, wenn nicht den wichtigsten Platz in zellulär vermitteltem Tumor-Immun-Escape ein (Onizuka *et al.* 1999; Shimizu *et al.* 1999). Curiel *et al.* konnten 2004 beweisen, dass Tregs eine immunopathologische Rolle bei Krebserkrankungen im Menschen spielen (Curiel *et al.* 2004). Die Autoren zeigten, dass Tregs generelle und tumorantigenspezifische T-Zellantworten inhibieren, was das humane und murine Tumorstadium begünstigte. Außerdem wanderten Tregs vermehrt in das maligne Gewebe ein, hingegen weniger in angrenzende Lymphknoten. Chemotaxis der Tregs wurde durch tumorales und von Makrophagen produziertem CCL22 angetrieben. Letztendlich war das erhöhte Treg-Auftreten mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert (Curiel *et al.* 2004). Es ist auffällig, dass bei Tumorkranken und in tumortragenden Mäusen erhöhte Treg-Zahlen gefunden wurden, was ihre Rolle in dieser Erkrankung hervorhebt. nTregs gelten als anerg, d.h. TCR-Stimulation alleine kann keine Proliferation induzieren. Die Gruppe um Zitvogel konnte interessanterweise zeigen, dass Tumorzellen bei DCs zu einem unreifen Phänotyp mit reduzierter MHC-II, CD86 und CD80 Expression führten und diese DCs im Lymphknoten

durch TGF $\beta$ -Sekretion die Proliferation von Tregs induzierten (Ghiringhelli *et al.* 2005b). Auch iTregs tragen zum Tumorwachstum bei (Liu *et al.* 2007b; Valzasina *et al.* 2006). Die im Mausmodell untersuchte CD4<sup>+</sup> T-Zellkonvertierung war hierbei abhängig von tumoralem TGF $\beta$  (Liu *et al.* 2007b).

Durch verstärktes Anlocken und Einwandern regulatorischer T-Zellen in das maligne Gewebe, Expansion dieser nTregs und Induktion von iTregs aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen trägt der Tumor zu einem suppressivem Milieu bei, das eine effektive antitumorale Immunantwort blockiert. Näheres über suppressive Mechanismen s.h. Kapitel 5.2.2.

### **1.3.2 Defizitärer Immunstatus bei Kopf-/Halstumorpatienten**

2008 wurden in Deutschland ca. 500.000 neue Fälle von Krebserkrankungen erfasst, 3,5% davon betrafen den Kopf-/Halsbereich (Mund und Rachen sowie Kehlkopf) (GEKID and RKI 2012). Die Inzidenz für Mund- und Rachenkrebs ist leicht steigend in den vergangenen 10 Jahren (GEKID and RKI 2012). Ca. 200.000 Patienten starben 2008 in Folge ihrer Krebserkrankung; 3,0% davon waren an einem Kopf-/Halstumor (KHT) erkrankt. Männer erkranken drei- bis siebenmal (Kehlkopf) häufiger als Frauen. Mund- und Rachenkrebs rangiert auf Platz 5 der häufigsten Krebsleiden bei Männern (GEKID and RKI 2012). Diese Daten stimmen mit aktuellen Statistiken aus den USA überein (Siegel *et al.* 2012). Im internationalen Vergleich altersstandardisierter Neuerkrankungs- und Sterberate rangiert Deutschland für Kopf-/Halstumore bei Männern zwischen Platz 5 (Kehlkopf) und 9 (Mund/Rachen) (GEKID and RKI 2012). Trotz verbesserter diagnostischer Methoden, operativer Techniken und neuer Chemotherapeutika hat sich die 5-Jahresüberlebensrate während der letzten 30 Jahre kaum gebessert (Kim *et al.* 2002). Sie hält sich hartnäckig bei ca. 50% (GEKID and RKI 2012). Kopf-/Halstumoren legt man vor allem zwei Ursachen zu Grunde: Infektion mit onkogenem humanem Papillomavirus (20-30%) und multiple genetische Schäden v.a. in Folge von Konsum karzinogener Substanzen wie Tabak und Alkohol (Gillison *et al.* 2000; Tran *et al.* 2007). In beiden Fällen spielt das Immunsystem eine entscheidende Rolle: im ersten Fall gelingt es dem Immunsystem nicht den Körper vom Virus zu befreien, dessen virale Antigene als stark immunogen gelten. Nach einer gewissen Zeit entfaltet das Virus seine onkogene Eigenschaft und führt über prä-maligne Veränderungen zu invasiven Krebszellen (Gillison *et al.* 2000; zur Hausen H. 2002). Im zweiten Fall führen der chronische Tabak- und Alkoholkonsum zu einem inflammatorischem Prozess, der eindeutig mit Krebsentstehung assoziiert ist (Brennan *et al.* 1995; Grivnenikov *et al.* 2010).

Die absolute Anzahl zirkulierender CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten ist bei KHT-Patienten stark reduziert, wobei der prozentuale Anteil innerhalb der Populationen verglichen zu gesunden Spendern nicht verändert ist (Kuss *et al.* 2004). Patienten mit aktivem Krankheitsgeschehen zeigen außerdem eine reduzierte Zahl an CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen verglichen zu Patienten ohne akute Symptomatik. Patienten mit rezidivierender Erkrankung besitzen am wenigsten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (Kuss *et al.* 2004). Die verminderte Anzahl kann auf mindestens zwei Ursachen zurück zu führen sein: Zum einen konnte eine verstärkte *ex vivo* Spontanapoptoserate bei PBMCs und tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) von KHT-Patienten verglichen zu normalen Kontrollen beobachtet werden (Reichert *et al.* 2002;Saito *et al.* 1999). Hierbei war v.a. das T-Zellkompartiment betroffen (Saito *et al.* 1999). Erhöhte Fas-Expression auf CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>Zellen von KHT-Patienten und gleichzeitig starke FasL-Expression auf Tumorzellen können diese Zellen zugänglicher für proapoptische Signale machen (Hoffmann *et al.* 2002;Reichert *et al.* 2002). Zusätzlich war die Konzentration an löslichem Fas-Ligand im Serum von KHT-Patienten erhöht (Hoffmann *et al.* 2002). Außerdem wird das T-Zellkompartiment durch erhöhten Zellturnover von CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Effektor-T-Zellen (Tsukishiro *et al.* 2003) und eingeschränkter Signalübertragung aufgrund reduzierter Expression der Zeta-Kette des T-Zell-Rezeptor restringiert (Baniyash 2004;Kuss *et al.* 2003;Reichert *et al.* 2002). Auf der anderen Seite konnte in der Zirkulation von KHT-Patienten ein erhöhter Anteil Tregs gefunden werden (Strauss *et al.* 2007b;Wild *et al.* 2010). Diese Beobachtung trifft auch auf andere Tumorentitäten zu und unterstreicht deren Bedeutung in malignen Erkrankungen (Jeron *et al.* 2009;Ormandy *et al.* 2005;Shenghui *et al.* 2011). Tregs können die Proliferation von T-Lymphozyten hemmen und Apoptose induzieren (s.h. Kapitel 5.2.2). Auch der Anteil myeloider regulatorischer Zellen (MDSCs, *myeloid derived suppressor cells*) ist im Blut von KHT-Patienten erhöht (Brandau *et al.* 2011). Des Weiteren korrelierte bei KHT-Tumoren die Infiltration tumorassoziierter Makrophagen, denen eine tumorfördernde Rolle zugesprochen wird, mit Metastasierung und fortgeschrittenem Tumorstadium (Mantovani *et al.* 2002;Marcus *et al.* 2004). All diese Faktoren führen zu einer reduzierten Immunkompetenz von KHT-Patienten. Sind diese Beobachtungen Ursache oder Folge der Erkrankung? Die Antwort ist nicht einfach (Dunn *et al.* 2002). Tatsache ist, dass Tumore im Kopf-/Halsbereich stark mit dem immunologischen Status verknüpft sind. Diese Tumorentität bietet sich also an, immunologische Tumor-Wirt-Untersuchungen durchzuführen.

## 1.4 Immuntherapie

### 1.4.1 Grundlagen und Meilensteine der Immuntherapie

1866 beobachtete Wilhelm Busch bei einer 43-jährigen Patientin mit inoperablem Sarkom eine Spontanremission, nachdem sie nach erfolgter Teilresektion an einem Erysipel<sup>2</sup> erkrankte. Im Jahr darauf führte der Bonner Chirurg die erste dokumentierte Krebsimmuntherapie durch (Abel 2001). Weitere Meilensteine der Immuntherapie finden sich in Tabelle 1.2.

**Tab. 1.2: Meilensteine der Immuntherapie**

1796	Jenner führt die Impfung gegen Pocken ein, wofür er Vaccinia Virus (Kuhpocken) verwendete (Waldmann 2003)
1867	Karl David Wilhelm Busch, Chirurg in Bonn, führt die erste dokumentierte Krebsimmuntherapie durch (Abel 2001)
1891	William Coley, Chirurg in New York, behandelt ebenfalls Sarkompatienten mit Bakterieninjektionen (Mellman <i>et al.</i> 2011)
1896	Paul Ehrlich definiert mit seiner Seitenkettentheorie erstmalig das Schlüssel-Schloss-Prinzip von Rezeptoren und ihren Liganden sowie Antikörpern als humorale Abwehr gegenüber Toxinen. Bei der Chemotherapie gälte das gleiche Prinzip zwischen bestimmten Molekülen und Tumoren (Piro <i>et al.</i> 2008;Silverstein 1999)
1900/1909	Paul Ehrlich zeigt die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen auf (Ehrlich 1909)
1957	Burnet macht Antigene auf der Zelloberfläche dafür verantwortlich, dass Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden bevor sich ein Geschwulst manifestiert (BURNET 1957a;BURNET 1957b)
1965	Entdeckung von Interleukin-2 (Gordon and MacLean 1965)
1970	Morton behandelt Melanompatienten mit einer Injektion aus bestrahlten Tumorzellen und BCG als Adjuvans (Morton <i>et al.</i> 1970)
1970	Thomas behandelt einen Leukämiepatienten erfolgreich durch Knochenmarktransplantation von einem Verwandten. Er erhält für seine Pionierarbeit auf diesem Gebiet seit den 1950er Jahren den Nobelpreis für Physiologie und Medizin 1990 (Buckner <i>et al.</i> 1970)
1975	Georg Köhler und César Milstein entwickeln die Hybridomtechnologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Kohler and Milstein 1975)
1980	Die WHO erklärt die Pocken für ausgestorben
1982	erfolgreiche Behandlung von B-Zell-Lymphom mit monoklonalem Antikörper (Miller <i>et al.</i> 1982)
1986	Muromonab-CD3 (OKT3) wird als erster monoklonaler Antikörper von der FDA zugelassen (Ortho Multicenter Transplant Study Group 1985)
1986	Herstellung eines humanisierten Antikörpers (Jones <i>et al.</i> 1986)

<sup>2</sup> Wundrose. Durch Streptococcus pyogenes hervorgerufene Infektion der Haut, die häufig mit Fieber einhergeht.

1986-2000	IL-2, IFN $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , werden zur Therapie von Neoplasien, Hepatitis und Multipler Sklerose zugelassen (Waldmann 2003)
1988-1992	Isolation und Klonierung des ersten humanen tumorassoziierten Antigens MAGE-1, das von CTL erkannt wird (Traversari <i>et al.</i> 1992)
2008	Vollständige Tumorregression eines Melanompatienten nach <i>ex vivo</i> Aktivierung und Klonierung autologer melanomantigenspezifischer CD4-T-Zellen (Hunder <i>et al.</i> 2008)
2010	FDA-Zulassung für Provenge® (Sipuleucel T) gegen metastasierten Prostatakrebs, hierbei werden autologe PBMCs <i>ex vivo</i> mit einem Tumorpeptid aktiviert und reinjiziert (Sharma <i>et al.</i> 2011).
2011	FDA-Zulassung von Ipilimumab (CTLA-4 antagonistischer Antikörper) gegen metast. Melanom (Sharma <i>et al.</i> 2011)

Für eine effektive Immunantwort sind drei Schritte nötig: 1. Antigenaufnahme und Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen (APC) wie DCs oder B-Zellen. 2. APC müssen dann das Tumormilieu verlassen, in sekundäre Lymphgewebe einwandern und dort die Antigene den T-Zellen präsentieren und diese aktivieren. 3. Tumorantigenspezifische T-Zellen wandern in das Tumormilieu ein, wo sie ihre Effektorfunktion ausüben müssen.

Hierfür müssen viele Barrieren überwunden werden: häufig ähneln Tumorantigene körpereigenen Antigenen, therapeutische Immunantwort darf nicht in Autoimmunität umschlagen, und wie in den Kapiteln 1.3 beschrieben kann dieser Prozess durch verschiedene Mechanismen beeinträchtigt sein. Daraus ergeben sich prinzipiell zwei Möglichkeiten, wie bei einer Krebsimmuntherapie vorgegangen werden kann: 1. protumorale Aktivitäten hemmen oder 2. antitumorale Aktivitäten fördern. Dies kann sowohl auf zellulärer Ebene, als auch auf humoraler Ebene geschehen. Immunmodulatoren, die über PRRs wirken, zielen darauf ab, das Immunsystem zu aktivieren. Das kürzlich erworbene Wissen, dass auch Tumorzellen PRRs tragen, sollte manche Therapien überdenken und aus einer neuen Perspektive betrachten. Welche Zellen werden aktiviert und welche Folgen hat das? Kommt es zu synergistischen oder gar kontraproduktiven Effekten? Je besser die PRR-vermittelte immunologische Tumor-Wirt-Interaktion verstanden wird, umso rationaler kann antitumorale Immuntherapie gestaltet werden.

Unspezifische Aktivierung von Immunzellen kann z.B. über IL-2 und TNF $\alpha$  erfolgen. Vaskularisierung von Tumoren versucht man mit Antikörpern gegen VEGF zu bekämpfen. Des Weiteren blockiert man mit antagonistischen Antikörpern z.B. gegen CTLA-4 und PD-1 koinhibitorische Signale auf T-Zellen. Da CTLA-4 gleichzeitig die Aktivität von Tregs fördert ist dies ein vielversprechender Ansatz. Generell zeigt die Depletion von Tregs eine teilweise Remission/Verzögerung des Tumorwachstums. Ein weiterer Ansatz besteht darin

autologe T-Zellen *ex vivo* mittels tumorspezifischer Antigene (TAAs) zu aktivieren und zu klonieren und sie dann zurück in den Patienten zu injizieren (Rosenberg *et al.* 2008). Diese Methode wird adoptiver T-Zelltransfer genannt. Ein verbesserter Effekt zeigt sich hierbei, wenn dem adoptiven T-Zelltransfer eine Lymphdepletion voraus geht. Hierbei werden Tregs und gleichzeitig andere Lymphozyten entfernt (Rosenberg *et al.* 2008; Wrzesinski *et al.* 2007). Doch wie lange hält dieser aktivierte Immunitätszustand an? T-Zellen besitzen nur eine beschränkte Lebensdauer. Zusätzlich ist das Phänomen des *activation induced cell death* bei Lymphozyten ausführlich beschrieben (Lieberman *et al.* 2012). Ziel sollte daher die Induktion einer beständigen systemischen Immunität sein, die nur über T-Zellaktivierung in sekundären lymphatischen Organen und der Generierung von Gedächtniszellen gewährleistet wird. Primäres Ziel sind hierbei die DCs. Moderne Krebsimmuntherapie bestand zunächst darin kurze Peptide zu verabreichen (Rosenberg *et al.* 2004). Der Erfolg blieb jedoch aus, was sich mit dem heutigen Wissen durchaus erklären lässt. Kurze Peptide haben eine kurze Halbwertszeit und es ist fraglich, ob sie von DCs prozessiert und präsentiert werden können. Zugleich nimmt eine DC ohne ko-stimulatorische Signale eher einen tolerogenen Zustand an (DRESSER 1961; Mellman *et al.* 2011). DC-Stimulation kann über zwei Wege stattfinden: analog zum adoptiven T-Zelltransfer *ex vivo* oder aber direkt intrakorporal. Aufgrund des geringeren technischen und personellen Aufwands wird die zweite Methode bevorzugt. Wie in Kapitel 1.1 erwähnt werden DCs über PRRs aktiviert und erlangen einen stimulatorischen, reifen Phänotyp. Diese Erkenntnis macht man sich bereits in der antibakteriellen/antiviralen Impfpraxis zunutze: so enthält z.B. der Impfstoff Cervarix® gegen Gebärmutterhalskrebs sowie Fendrix® gegen Hepatitis-B das Adjuvanz AS04, bestehend aus detoxifiziertem LPS (Baldwin *et al.* 2012; Boland *et al.* 2004; Roteli-Martins *et al.* 2012). Diese Strategie soll auch bei der Krebsimmuntherapie angewendet werden. Der große Unterschied besteht natürlich darin, dass es sich bei der einen Anwendung um eine Prophylaxe handelt, bei der anderen um die Therapie eines etablierten Tumors.

Seit Jahren laufen diesbezüglich *in vitro* und *in vivo* Studien im Mausmodell, sowie erste Anwendungen am Menschen, in denen PRR-Liganden zur Immunaktivierung verabreicht werden (Broomfield *et al.* 2009; Dudek *et al.* 2007; O'Neill *et al.* 2009; Salem *et al.* 2006; Wang *et al.* 2008). Die Idee dahinter ist, den Toleranzzustand des Immunsystems zu überwinden, um eine Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene (TAAs) zu initiieren. Ein weiterer Ansatzpunkt besteht darin, DCs ein tumorales Antigen zur Verfügung zu stellen (Schnurr *et al.* 2001). Hierbei variiert man pure Antigene mit toten Tumorzellen und -lysaten, die mehrere verschiedene Antigene hervorbringen (Lesterhuis *et al.* 2011). In diesem Zusammenhang kann die Art der Induktion des Zelltods entscheiden, ob eine antitumorale Immunität initiiert

wird oder nicht bzw. in welchem Ausmaß (Kono and Rock 2008;Strome *et al.* 2002). Eine weitere Möglichkeit besteht darin DCs mit TAAs zu beladen bei gleichzeitiger Aktivierung durch einen PRR-Liganden (Hokey *et al.* 2005). Kapitel 1.2 ging auf unterschiedliche Arten von Zelltod ein und wie sich diese in der Freisetzung immunogener DAMPs unterscheiden.

### 1.4.2 Immuntherapie bei Kopf-/Halstumoren

Standardtherapie bei Tumoren im Kopf-/Halsbereich sind Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Da sich jedoch das Gesamtüberleben der Patienten in den letzten Jahrzehnten nicht wirklich verbessert hat, werden neue Therapiealternativen angestrebt. Die Immuntherapie stellt eine vielversprechende Alternative dar. Hierbei kommen zum einen monoklonale Antikörper als auch Vakzinierungsstrategien zum Einsatz. Für beides werden spezifische bzw. überexprimierte TAAs benötigt. Von diesen konnten bisher nur wenige identifiziert werden (Tannapfel and Weber 2001). Die Überexpression des Wachstumsrezeptors EGFR macht man sich bereits erfolgreich mithilfe des monoklonalen Antikörpers Cetuximab zunutze (Baselga *et al.* 2005;Herbst *et al.* 2005). Jedoch limitieren häufig auftretende Mutation und erworbene Resistenzen den Erfolg (Wheeler *et al.* 2010).

Mithilfe von Gentherapie versucht man mutiertes p53 gegen funktionelles p53 zu ersetzen, doch die Erfolge sind beschränkt (Nemunaitis and Nemunaitis 2011). So zeigten z.B. nur 6 von 106 behandelten Patienten ein komplettes oder teilweises Ansprechen auf die Therapie.

Eine Alternative stellen mit p53 beladene autologe DCs dar (Andrade Filho *et al.* 2010;Tokunaga *et al.* 2005).

Da 50% der Tonsillenkzinome mit einer HPV-Infektion korrelieren (Tran *et al.* 2007), bieten sich HPV-assoziierte Antigene für die Vakzinierungsstrategie an. Der Vorteil hierbei ist, dass man aufgrund spezifischer Antigene das Ansprechen der Immunzellen mittels z.B. Tetramerfärbungen oder Antikörpertiterbestimmungen überwachen kann (Malyguine *et al.* 2012). Leider korrelieren diese nicht zwangsläufig mit klinischem Ansprechen der Patienten auf die Therapie (Malyguine *et al.* 2012).

Eine andere Möglichkeit stellt die *ex vivo* DC-Beladung mit autologen, bestrahlten Tumorzellen und Verabreichung in den Patienten dar. Bei dieser Methode wird eine Vielzahl an patientenspezifischen, tumoralen Antigenen bereitgestellt. Doch trafen erste Versuche auf Probleme wie bakteriellen Befall (sehr typisch bei Gewebe aus dem Mundbereich) und zu geringe Immunogenität der Tumorzellen (Davidson *et al.* 2009).

Wie kann die Immunogenität von toten Tumorzellen erhöht werden? PRR-Liganden wurden bisher nur als Immunverstärker eingesetzt. Doch ihr bekanntes Wirkspektrum hat sich



mittlerweile erweitert: sie können auch direkt auf Tumorzellen wirken und einige von ihnen induzieren Zelltod.

Im Focus der vorliegenden Arbeit liegen die therapeutischen PRR-Liganden Imiquimod, ein TLR7-Agonist, und Poly(I:C), das sowohl TLR3 als auch MDA5 aktivieren kann. Des Weiteren wird auf HMGB1, einem endogenen Gefahrenmolekül, das bei Tumorzelltod freigesetzt wird, näher eingegangen.

### 1.4.3 Imiquimod in der immunologischen Tumor-Wirt Interaktion

Das Imidazoquinolin-Derivat Imiquimod kann im Tumormikromilieu auf Immunzellen, Tumorzellen und Endothelzellen wirken. Details werden im Folgenden erklärt:

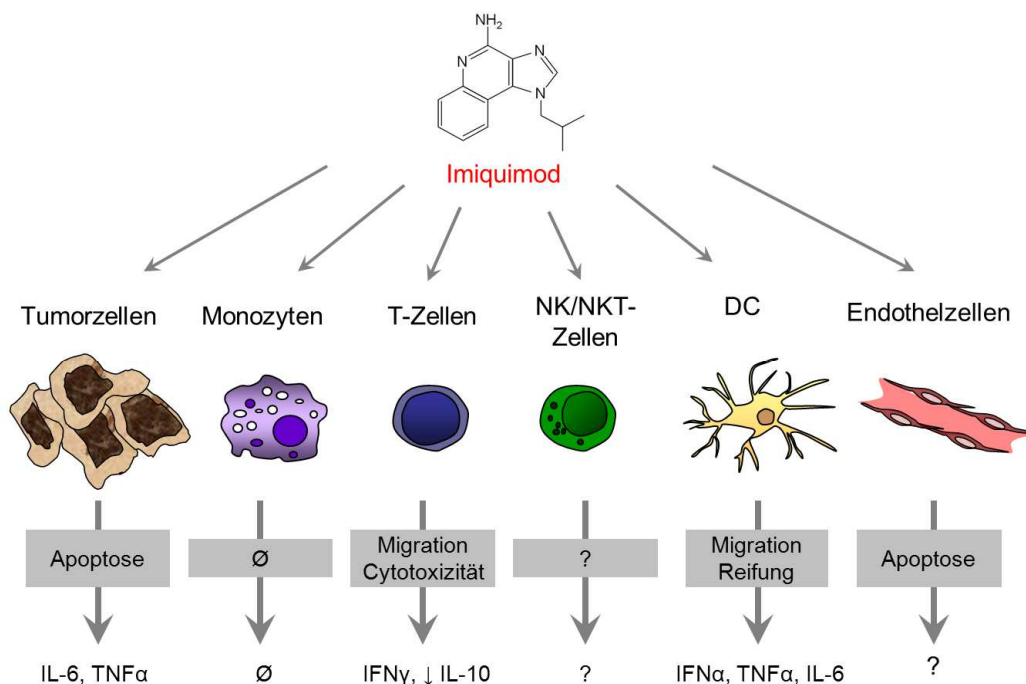
1988 beschrieb Bernstein zum ersten Mal den antiviralen Effekt von Imiquimod nach topischer Behandlung von Genitalwarzen (Herpes simplex Virus) bei Meerschweinchen (Harrison *et al.* 1988). Die Wirkung war nicht auf eine direkte virutoxische Aktivität zurück zu führen, sondern korrelierte mit den im Serum gemessenen IFN $\alpha$ -Mengen. Reiter konnte 1994 zeigen, dass auch bei Mäusen nach oraler Applikation die IFN $\alpha$ -Konzentrationen im Blut stiegen (Reiter *et al.* 1994). Der Vorteil von Imiquimod gegenüber anderen getesteten *small molecules* ist die Fähigkeit auch bei menschlichen Zellen große Mengen an IFN $\alpha$  zu induzieren (Weeks and Gibson 1994). Schnell war klar, dass Imiquimod großes Potential als *immune response modifier* besaß. Zielzellen des Immunsystems wurden identifiziert, doch nicht die Zielstruktur (Testerman *et al.* 1995). Imiquimod als Ligand von TLR7 wurde erst 2002 durch die Gruppe um Akira beschrieben (Hemmi *et al.* 2002). In Folge von TLR7-Aktivierung durch Imiquimod wird MyD88 rekrutiert, was zu einer Anschaltung des NF $\kappa$ B- oder MAPK-Signalwegs führt.

Erst 2004 konnte einzelsträngige (ss, für *single stranded*) RNA als natürlicher Ligand für TLR7 identifiziert werden (Heil *et al.* 2004). Die Gruppe konnte zeigen, dass der Erkennungsprozess sequenzunabhängig statt findet. Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Interaktion ist eine Uridin-reiche Sequenz. Da die Erkennung über das Zucker-Gerüst des Einzelstrangs erfolgt, ist Ribose ebenfalls essentiell. Uracil kann als einzige Base keine Doppelstränge bilden und garantiert somit, dass bei niedrigem endosomalen pH-Wert die RNA als Einzelstrang vorliegt. Das hat aber zur Folge, dass TLR7 auch eigene RNA erkennt. Dies passiert jedoch in einer intakten Zelle aufgrund der endosomalen Lokalisation des Rezeptors nicht (Diebold *et al.* 2006).

Der Effekt von Imiquimod auf einzelne Immunzelltypen ist mittlerweile sehr gut beschrieben. In vielen Publikationen werden Imiquimod und Resiquimod in einem Atemzug genannt. Der wesentliche Unterschied der beiden ist, dass Imiquimod ausschließlich über TLR7 wirkt, während Resiquimod sowohl TLR7 als auch TLR8 aktiviert (Smits *et al.* 2008). Abbildung 1.1 gibt eine schematische Übersicht über die rein durch Imiquimod vermittelten Effekte auf DCs (Gibson *et al.* 2002;Lore *et al.* 2003;Russo *et al.* 2011;Suzuki *et al.* 2000), Makrophagen/ Monozyten (Gorden *et al.* 2005;Wagner *et al.* 1999), T-Zellen (Ambach *et al.* 2004;Barnetson *et al.* 2004;Huang *et al.* 2009b;Ooi *et al.* 2006) und NK/NKT-Zellen (Girart *et al.* 2007;Gorski *et al.* 2006;Raftery *et al.* 2008).

Da in Neutrophilen keine TLR7 Expression nachgewiesen wurde, existieren nur vereinzelte Studien über einen möglichen Einfluss von Imiquimod auf diesen Zelltyp. Allerdings beschrieb kürzlich eine Gruppe eine verstärkte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von Granulozyten nach Imiquimod-Stimulation (van Bruggen R. *et al.* 2010). Da Imiquimod auch über Adenosin-Rezeptoren wirken kann, könnte dies den unerwarteten Effekt erklären (Schon *et al.* 2006).

Imiquimod werden auch antiangiogenetische Eigenschaften zugesprochen (Li *et al.* 2005;Majewski *et al.* 2005). Dies geschieht über komplexe Regulierung pro-/antiangiogenetischer Zytokine und Faktoren wie z.B. Interferone und den Angiogeneseinhibitor TIMP. Zusätzlich wirkt Imiquimod direkt proapoptotisch auf Endothelzellen (Li *et al.* 2005;Majewski *et al.* 2005).



**Abb. 1.1: Effekt von Imiquimod auf Tumor-, Immun- und Endothelzellen.** In Anlehnung an (Smits *et al.* 2008).

Imiquimod kann auch Tumorzellen direkt beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass Imiquimod *in vitro* direkt proapoptotisch wirkt. So induziert Imiquimod bei Plattenepithelkarzinomzelllinien Bcl-2 und Caspase-abhängig Zelltod (Schon *et al.* 2003). Hingegen hatten die Todesrezeptor-Signalwege über Fas, TRAIL und TNF $\alpha$  keinen Einfluss beim Imiquimod-induzierten Zelltod. Neben reduziertem Überleben erhöhten Imiquimod-behandelte Blasenkarzinomzelllinien die Sekretion von IL-6 und TNF $\alpha$  (Smith *et al.* 2007). Ein Jahr später konnte erneut die Gruppe um Scherr zeigen, dass Imiquimod die Expression von c-Myc sowie zusätzlich seine Aktivität reduziert (Liu *et al.* 2008a). c-Myc als Transkriptionsfaktor reguliert viele Prozesse innerhalb des Zellzyklus und ist in vielen Tumorentitäten mutiert (Wang *et al.* 2011). Auch bei humanen und murinen Nierenkarzinom-Zelllinien wird Apoptose induziert.

Die Mehrheit der Studien, die Imiquimod im Zusammenhang mit Krebsimmuntherapie untersuchen richten den Focus auf Imiquimod-Effekte auf Immunzellen und wie diese folglich auf Tumorzellen wirken. Nur Studien über B-Zellleukämie analysieren die umgekehrte Reihenfolge. Shi *et al.* konnten demonstrieren, dass wiederholte TLR7-Aktivierung von primären CLL B-Zellen zu einer Art Toleranz-Zustand mit reduzierten IRAK1 (*interleukin-1 receptor associated kinase 1*)-Leveln, und reduzierter JNK- und NF $\kappa$ B-Regulation führte (Shi *et al.* 2007). Daraus resultierte eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Vincristin und cytotoxischen Effektorzellen (Spaner *et al.* 2006). Die Feedback-Effekte von Imiquimod-behandelten Tumorzellen auf Immunzellen sind bislang kaum untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

#### **1.4.4 Poly(I:C) in der immunologischen Tumor-Wirt-Interaktion**

Auch die synthetische Nukleinsäure Poly(I:C) kann im Tumormikromilieu auf Immunzellen, Tumorzellen und Endothelzellen wirken. Poly(I:C) ist eine ca. 1000 Basenpaar lange doppelsträngige RNA, in deren einem Strang ausschließlich die Purinbase Inosin polymerisiert ist und im anderen Cytosin. 1967 wurde Poly(I:C) als antiviralwirkende Substanz entdeckt, die IFN $\alpha$ -Produktion *in vitro* und *in vivo* förderte (Field *et al.* 1967). Nach seiner antiviralen Aktivität wurde ihm schnell eine antumorale Wirkung zugesprochen (Ball and McCarter 1971; Mathe 1971). Erst 2001 wurde TLR3 als Rezeptor für Poly(I:C) identifiziert (Alexopoulou *et al.* 2001). Dieser bindet über seine N-terminale Ectodomäne, die 23 Motive der *leucine-rich domain* enthält und eine Hufeisenform bildet (Bell *et al.* 2006). Das Zucker-Ribose-Gerüst einer RNA von mindestens 39 Basenpaare ist für die Interaktion mit den vier Bindungsstellen eines TLR3-Dimers notwendig (Liu *et al.* 2008b). Neueste

Untersuchungen zeigen, dass TLR3 nicht nur intrazellulär in Endosomen lokalisiert ist, sondern auch auf der Zelloberfläche von z.B. Fibroblasten und Epithelzellen zu finden ist (Kawai and Akira 2008; Matsumoto *et al.* 2002; Weber *et al.* 2012). Yoneyama *et al.* konnten 2004 zeigen, dass Poly(I:C) antivirale Aktivität über den cytosolischen Rezeptor RIG-I vermittelt (Yoneyama *et al.* 2004). Nachfolgende Untersuchungen hingegen haben ergeben, dass Poly(I:C) vorzugsweise über MDA5-Aktivierung wirkt (Gitlin *et al.* 2006). Es scheint, dass kommerziell erhältliches Poly(I:C), das aus ca. 1000 Basenpaaren besteht MDA5 aktiviert, hingegen enzymatisch verdautes und somit kürzeres Poly(I:C) RIG-I (Kato *et al.* 2008).

Abbildung 1.2 gibt eine schematische Übersicht über die Effekte von Poly(I:C) auf neutrophile Granulozyten (Tamassia *et al.* 2008), T-Zellen (Caron *et al.* 2005; Komai-Koma *et al.* 2004; Wesch *et al.* 2006), NK-Zellen (Perrot *et al.* 2010) und myeloide DCs (Perrot *et al.* 2010; Rouas *et al.* 2004) (Cella *et al.* 1999; de Jong *et al.* 2002; Kadowaki *et al.* 2001; Rouas *et al.* 2004; Schulz *et al.* 2005). Zusätzlich hemmt Poly(I:C) IL-1 $\alpha$ -abhängig die Proliferation von Endothelzellen und kann somit zur antitumoralen Wirkung beitragen (Garfinkel *et al.* 1992).

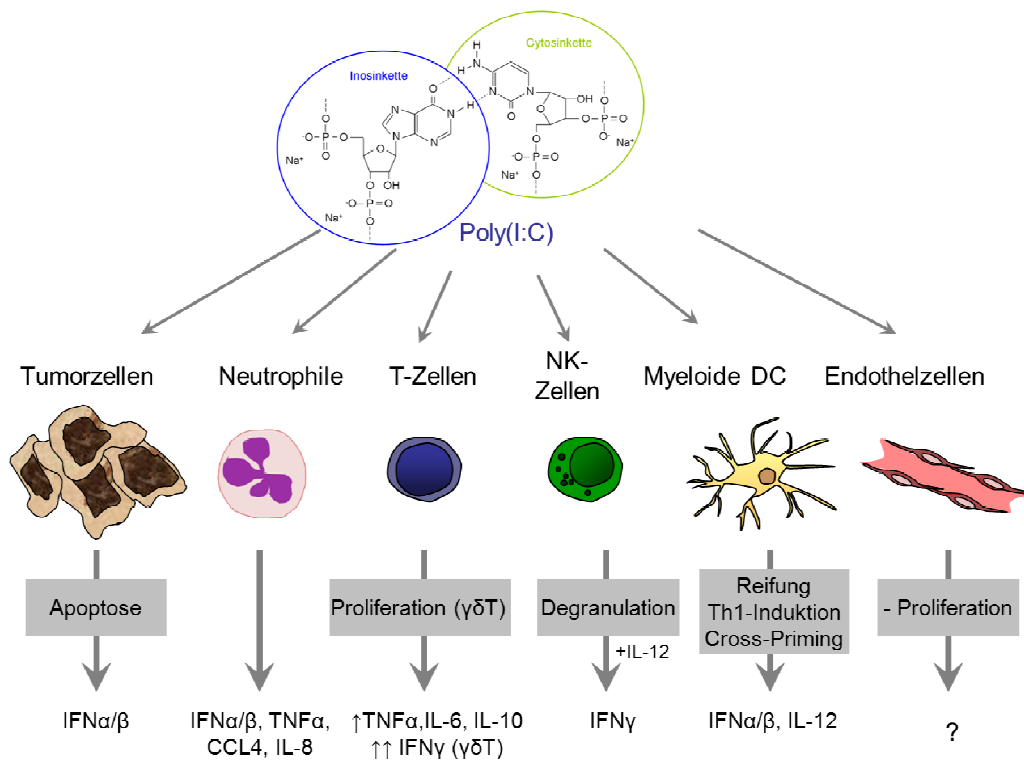


Abb. 1.2: Effekt von Poly(I:C) auf Tumor-, Immun- und Endothelzellen.

Da auch solide Gewebe TLR3, MDA5 und RIG-I exprimieren ist ein direkter Effekt von Poly(I:C) auf entartete Gewebszellen nicht verwunderlich (Lech *et al.* 2010; Zarembek and Godowski 2002). Poly(I:C) wirkt *in vitro* proliferationshemmend und proapoptotisch. Die

Hemmung der Proliferation war mit DNA- und rRNA-Fragmentierung assoziiert, die jedoch nicht Caspase-1 oder Caspase-3 abhängig war (Hirabayashi *et al.* 1999). Die antitumorale Wirkung kann Poly(I:C) am besten entfalten, wenn es direkt in das Cytosol der Zelle gelangt. Dies kann *in vitro* durch Elektroporation oder in Liposomen verpackt geschehen (Besch *et al.* 2009; Hirabayashi *et al.* 1999). Bei diesem Weg der Administration wird der cytosolische Rezeptor MDA5 aktiviert, was nachfolgend den intrinsischen Apoptoseweg anschaltet und zu Caspase-9-Aktivierung führt (Besch *et al.* 2009). Bei konventioneller Behandlung von Zellen und TLR3-Aktivierung sind häufig zusätzliche Reagenzien notwendig, um Apoptose zu induzieren (Friboulet *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2008; Weber *et al.* 2010). Hierbei wird der extrinsische Weg unter Beteiligung von Caspase-8 aktiviert (Salaun *et al.* 2006; Weber *et al.* 2010). TLR3-vermittelte Apoptose war in einem autokrinen Mechanismus IFN $\alpha$ / $\beta$ -abhängig (Salaun *et al.* 2006). Poly(I:C) wirkt z.B. nur auf Neuroblastomzelllinien proapoptisch, wenn diese sehr hohe Level TLR3 exprimierten (Chuang *et al.* 2011). Wie Poly(I:C)-behandelte Tumorzellen die Immunzellen beeinflussen ist kaum untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Poly(I:C)-behandelte Leukämiezellen besser von DCs phagozytiert und von NK-Zellen lysiert wurden (Lion *et al.* 2011). Außerdem waren Pankreasadenozarzinom- sowie Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-/Halsbereichs nach Vorbehandlung (endozytotische Aufnahme) mit Poly(I:C) suszeptibler gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zelllyse (Shojaei *et al.* 2009). Doch wie wirken die durch Poly(I:C) getöteten Tumorzellen auf umliegende Immunzellen? Diese Fragestellung ist bisher kaum untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

#### **1.4.5 HMGB1 in der immunologischen Tumor-Wirt-Interaktion**

Ein prototypisches DAMP ist das High mobility group box 1 (HMGB1) Protein. Es ist ein hochkonserviertes Protein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt (Bustin 1999). In einer intakten Zelle liegt es im Cytoplasma vor oder bindet im Zellkern an die kleinere Furche der DNA, was die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht (Bianchi and Beltrame 2000). In die gleiche Gruppe der Alarmine zählt man auch u.a. Hitzeschockproteine (Schmitt *et al.* 2007), Nukleinsäuren (Ishii *et al.* 2001), Harnsäure (Shi *et al.* 2003), S100 Proteine (Foell *et al.* 2007), Hepatom-derived growth factor (Zhou *et al.* 2004) und Adenosin/Adenosintriphosphat (Ia *et al.* 2003). Viele der folgenden, für HMGB1 beschriebenen Charakteristika, gelten auch für die übrigen Alarmine. Abbildung 1.3. bietet hierfür eine Übersicht. 1. HMGB1 wird in Folge von Zellstress und Verletzung von sterbenden Zellen freigesetzt (Bianchi 2007; Chen and Nunez 2010; Hwang *et al.* 2011). Dies ist v.a. für nekrotischen und spät-apoptotischen Zelltod beschrieben, da bei Apoptose durch

Abschnürung kleiner Körper und deren Phagozytose durch Immunzellen der Inhalt nicht freigesetzt wird (Green *et al.* 2009; Rovere-Querini *et al.* 2004; Scaffidi *et al.* 2002; Sims *et al.* 2010; Thorburn *et al.* 2009). Neueste Untersuchungen zeigen, dass HMGB1 auch pulsatil von Krebszellen in Folge von Behandlung mit bestimmten Chemotherapeutika und Bestrahlung freigesetzt werden kann (Apetoh *et al.* 2007; Tesniere *et al.* 2010). 2. Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, DCs und NK-Zellen, können auf Stimulation hin, v.a. durch Endotoxine, IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$ , DAMPs über spezialisierte Sekretion oder klassischen ER/Golgi-Transport freisetzen ohne zu sterben und somit einen Entzündungsprozess aufrechterhalten (Dumitriu *et al.* 2005; Gardella *et al.* 2002; Semino *et al.* 2005; Wang *et al.* 1999). 3. Extrazellulär vorliegend, rekrutiert und aktiviert HMGB1 Zellen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophile, Monozyten und DCs, die dann proinflammatorische Zytokine sezernieren, kostimulatorische Moleküle hochregulieren (DCs) und das adaptive Immunsystem anschalten (Andersson *et al.* 2000; Messmer *et al.* 2004; Orlova *et al.* 2007). NK-Zellen reagieren nur auf HMGB1, wenn weitere proinflammatorische Zytokine vorliegen (DeMarco *et al.* 2005). 4. HMGB1 fördert direkt und indirekt die Gewebsregeneration und stellt die Gewebshomöostase wieder her, die in Folge des Traumas oder der initiierten Inflammation zerstört wurde (Chen and Nunez 2010; Palumbo *et al.* 2007; Palumbo *et al.* 2004). In dieser komplexen Wirkweise werden HMGB1 daher sowohl anti- als auch protumorale Eigenschaften zugesprochen (Campana *et al.* 2008).

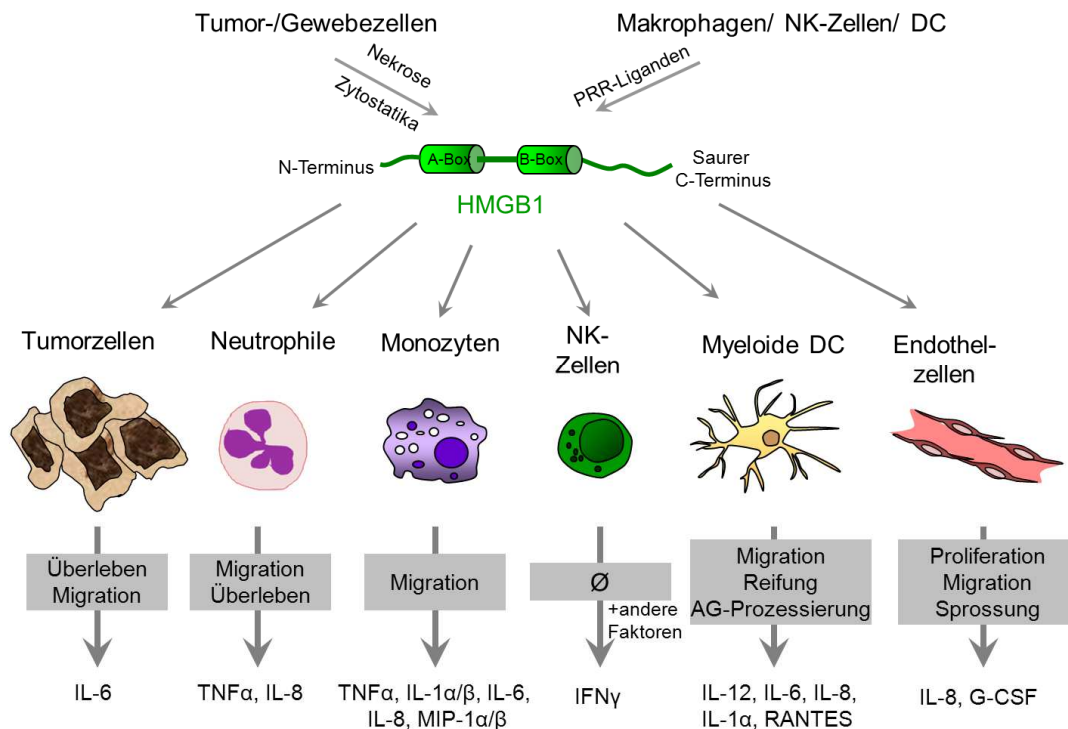


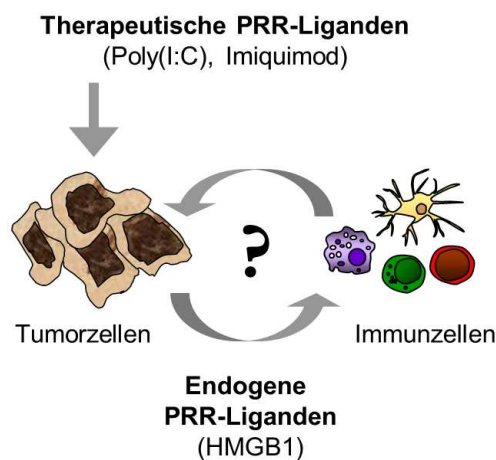
Abb. 1.3: Ursprung von HMGB1 und seine Effekte auf Tumor-, Immun- und Endothelzellen.

HMGB1 ist zur Initiierung der adaptiven Immunität über Aktivierung dendritischer Zellen notwendig; gleichzeitig ermöglicht es die Aufrechterhaltung einer chronischen Inflammation, die eng mit Krebsentstehung verwoben ist (Apetoh *et al.* 2007; Balkwill *et al.* 2005; Sims *et al.* 2010). Zusätzlich fördert es Neoangiogenese: zum einen direkt, da es Proliferation, Migration, Chemotaxis und Sprossung von Endothelzellen induziert (Mitola *et al.* 2006; Schlueter *et al.* 2005); zum anderen indirekt, da es Makrophagen anlockt, die pro-angiogenetisch wirken können (Venneri *et al.* 2007). Außerdem induziert HMGB1 die Sekretion von IL-8 und G-CSF in HUVEC (Treutiger *et al.* 2003). Gleichzeitig wirkt HMGB1 antiapoptotisch und schützt vor proapoptotischen Signalen (Brezniceanu *et al.* 2003). Die Unabhängigkeit von proapoptotischen Signalen ist elementar in der Krebsentstehung (Hanahan and Weinberg 2011). Dieser Effekt ist jedoch vom Redox-Zustand des Proteins abhängig. Tang und Kollegen konnten zeigen, dass reduziertes HMGB1 via RAGE-Interaktion Tumorzellen vor Chemotherapeutika-induzierter Apoptose bewahrt (Tang *et al.* 2010a). Oxidiertes HMGB1 hingegen erhöhte die Sensitivität. Zusätzlich erhöht extrazelluläres HMGB1 die Migration und Invasion von Tumorzellen, möglicherweise in einem autokrinen Mechanismus (Bassi *et al.* 2008; Yan *et al.* 2012). Inwieweit gebundene DNA in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt ist nicht bekannt, da ausschließlich funktionelles HMGB1 z.B. durch shRNA inhibiert wurde (Tang *et al.* 2010a). Auch gibt es keine Untersuchungen darüber, wie „künstliche“ HMGB1-DNA-Mischungen auf Tumorzellen wirken. Betrachtet man diese Fülle an Beweisen für die protumorale Aktivität von HMGB1 stellt sich die Frage, ob dieses Alarmin nicht auch auf Immunzellebene protumorale Wirkung besitzt. Wie eingangs erwähnt, begünstigen Tregs den Tumor-Immun-Escape. Wie wirkt also HMGB1 auf Tregs? Bisherige Untersuchungen fokussierten sich auf Zellen des angeborenen Immunsystems oder aber analysierten die Gesamtheit der T-Zellpopulation. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HMGB1 über TLR2, TLR4 sowie RAGE eine proinflammatorische Wirkung ausübt (Park *et al.* 2004; van Zoelen *et al.* 2009; Yang *et al.* 2007). Nur Signalvermittlung über CD24/Siglec-10 auf DCs konnte bisher antiinflammatorische Züge von HMGB1 aufzeigen (Chen *et al.* 2009).

## 1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Mustererkennungszellrezeptoren (PRR) befinden sich, wie lange angenommen wurde, nicht nur auf Zellen des angeborenen Immunsystems, sondern auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems und Tumorzellen. Daher bedarf es neuer Studien, den Effekt therapeutischer,

sowie endogener PRR-Liganden in der immunologischen Tumor-Wirt-Interaktion genauer zu charakterisieren, um das Design von Krebstherapien rationaler zu gestalten und zu verbessern. Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss von Mustererkennungsrezeptoren auf die Wechselwirkung zwischen Tumor- und Immunzellen phänotypisch als auch funktionell zu beschreiben. Es kommen immunologische Zellkulturmethoden wie Dichtezentrifugation und Durchflusszytometrie, sowie molekularbiologische Methoden wie quantitative *real-time* PCR zum Einsatz. Histologische Untersuchungen von humanen und murinen Tumoren ergänzen die Arbeit. Die Fragestellung wird aus zwei Blickwinkeln betrachtet, welche in Abbildung 1.4 zusammengefasst sind:



**Abb. 1.4: Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Im ersten Teil der Arbeit soll die Frage untersucht werden, unter welchen Bedingungen Poly(I:C) und Imiquimod Tumorzelltod induzieren und wie sich dieser auf eine Immunaktivierung auswirkt. Hierfür wird zunächst die immunogene Qualität des Zelltods hinsichtlich Zytokinausschüttung und Expression immunstimulatorischer Oberflächmoleküle untersucht. Anschließend werden die therapierten Tumorzellen mit verschiedenen Immunzellen kokultiviert. Zuletzt sollen in einem Mausmodell die Ergebnisse aus den *in vitro* Versuchen *in vivo* überprüft werden. Dieser Projektteil soll Aufschluss über die immunologische Tumor-Wirt-Interaktion nach PRR-induziertem Zelltod liefern.

Im zweiten Teil der Arbeit soll eine mögliche protumorale Aktivität des körpereigenen Gefahrenmoleküls HMGB1 über direkte Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Treg) untersucht werden. Hierfür werden Charakterisierungsstudien der HMGB1-Expression bei Kopf-/Halstumoren (KHT) in verschiedenen Kompartimenten durchgeführt. Außerdem werden Tregs und Effektor-T-Zellen (Teffs) von gesunden Spendern sowie KHT-Patienten



phänotypisch hinsichtlich HMGB1-erkennender Rezeptoren analysiert. Anschließend wird in Funktionsanalysen der Effekt von HMGB1 auf Tregs und Teffs untersucht. Hierbei sollen beteiligte Rezeptoren identifiziert werden und die Ergebnisse von gesunden Spendern mit denen von KHT-Patienten verglichen werden. Dieser Projektteil soll neue Erkenntnisse über immunologische Tumor-Wirt-Interaktion endogener PRR-Liganden liefern.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Aceton	AppliChem, Darmstadt, Deutschland (Dtl)
Acrylamid	Roth, Kalsruhe, Dtl.
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Citrat	Merck, Darmstadt, Dtl.
Citronensäure	Merck, Darmstadt, Dtl.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Kalsruhe, Dtl.
Dihydrorhodamin 123	Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
Eosin	Merck, Darmstadt, Dtl.
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Dtl.
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Dtl.
Gelatine	Merck, Darmstadt, Dtl.
Glycerin	Merck, Darmstadt, Dtl.
Glycin	Merck, Darmstadt, Dtl.
G418	PAA-Laboratories, Paschingen, Österreich
Hämatoxilin	Shandon ThermoScientific, Schwerte, Dtl.
Hepes Puffer	PanBiotech, Berlin, Dtl.
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt, Dtl.
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Dtl.
Kathon	Christ Chemie AG, Reinach, Dtl.
Methanol (CH <sub>4</sub> O)	JT.Backer, Deventer, Niederlande
Natrium Chlorid (NaCl)	Roth, Kalsruhe, Dtl.
Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Dtl.
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	AppliChem, Darmstadt, Dtl.
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Dtl.
Polyoxyethylen 20 (Tween 20)	Merck, Darmstadt, Dtl.
Para-Formaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Dtl.
Rinder Albuminserum (BSA)	PAA-Laboratories, Paschingen, Österreich
Salzsäure (HCl)	Roth, Kalsruhe, Dtl.
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	AppliChem, Darmstadt, Dtl.
Tromethamin (Tris)	AppliChem, Darmstadt, Dtl.
Triton X-100	Riedel-de Haën, Seelze, Dtl.

Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Tween ® 20	AppliChem, Darmstadt, Dtl.
Xylol	JT.Backer, Deventer, Niederlande

## 2.2 Puffer und Lösungen

Azid-PBS	150 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 15 mM NaN <sub>3</sub> pH 7,4
ELISA-Waschpuffer	1x PBS 0,05% Tween 20
MACS-Puffer	1x PBS 2 mM EDTA 0,5% BSA ph 7,2
TAE	40 mM Tris 2 mM EDTA 0,11% Eisessig ph 8,5
TBS ( <i>Tris buffered saline</i> )	20 mM Tris 1500 mM NaCl pH 7,4
TMB-Lösung	0,48% TMB 10% Aceton 90% Ethanol (100 V/V %) 0,6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
TMB-Substratpuffer	33 mM Citronensäure 0,02 % Kathon pH 4,1
PBS ( <i>phosphate buffer saline</i> )	150 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
Rxx10	RPMI 1640 1 % PenStrep 10 % FCS

Medium für Colo699	RPMI 1640 1 % PenStrep 10 % FCS 2 mg/ml G418 10 mM Hepes Puffer
10x Agarosegel loading buffer	250mg Bromphenolblau 33 ml 150 mM Tris ph 7.6 7 ml H <sub>2</sub> O 60 ml Glycerin

## 2.3 Zellkulturmaterialien

Accutase	PAA-Laboratories GmbH, Coelbe, Dtl.
CryoPure-Gefäß (1,8ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Dtl.
Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077-Lymphocyte	PAA-Laboratories, Paschingen, Dtl.
Microvascular endothelial cell growth	provitro, Berlin, Dtl.
PenStrep (Penicillin/Streptomycin)	PAA-Laboratories, Paschingen, Dtl.
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.
RPMI 1640	PAA-Laboratories, Paschingen, Dtl.
Reagiergefäße 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.
Transferpipette	Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.
Transwell 5 µm	Millipore, Schwalbach, Dtl.
Zellkulturflaschen T25, T75	Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.
Zellkulturplatte 6-well, 24-well	Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.
Zellkulturplatte 12-well	Greiner Bio-One, Frickenausen, Dtl.
Zentrifugenröhrchen 50ml	Greiner Bio-One, Frickenausen, Dtl.
Zentrifugenröhrchen 15ml	Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.

## 2.4 Zytokine und Stimulanzen

HMGB1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
IFNα/β	Peprtech, Hamburg, Dtl.
IL-2	Peprtech, Hamburg, Dtl.
IL-12	Peprtech, Hamburg, Dtl.
Imiquimod-R837	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

Imiquimod-R837 VacciGrade	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Lipopolysacharid (LPS)	Klaus Brandenburg, Forschungszentrum Borstel,
PHA (Phytohämagglutinin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Poly(I:C)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Poly(I:C) VacciGrade	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Treg Suppression Inspector CD2/CD3/CD28 MACSi Partikel	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Dtl.

## 2.5 Zelllinien

AccChina	Adenoidcystisches Karzinom (Acc), Wan-tao Chen, Laboratory of Oncological Biology, Shanghai, China
Colo699	1968 aus der Pleuraflüssigkeit einer 57-jährigen Patientin mit Lungenadenokarzinom etabliert
FaDu	1968 entstandende Zelllinie eines humanen Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx American Type Culture Collection (ATCC) Maryland, USA
HMEC	Bernhard Singer, Anatomie, Universitätsklinikum Essen
HEK blue I IFN $\alpha/\beta$	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
PCI-13	1989 aus einem Oropharynxkarzinom (Retromolar trigone), eines 50-jährigen Patient etabliert. Theresa L. Whiteside, University of Pittsburgh Cancer Institut

Alle Zelllinien wurden regelmäßig mittels Promocell PCR Kit (Promocell, Heidelberg, Dtl.) auf Mykoplasmenfreiheit untersucht.

## 2.6 Geräte und andere Materialien

Aqua B. Braun	B.Braun, Melsungen, Dtl.
BIDOC-IT M26X	UVP, LLC, Upland, CA, USA
CASY-Cups	Innovatis-Roche, Bielefeld, Dtl.
CASY-Modell TT	Innovatis-Roche, Bielefeld, Dtl.
CellTrix 50 $\mu$ m, steril	Partec, Görlitz, Dtl.

CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
Cryomold, Tissue-Tek	Sakura , Torrance, USA
Cryomold, Biopsy 10x10x5 mm	Sakura , Torrance, USA
Deckgläser (rechteckig, rund)	Roth, Kalsruhe, Dtl.
Elektrophorese System	Bio Rad, Hercules, USA
ELISA Nunc Maxisorbplatte	Thermo Scientific, Schwerte, Dtl.
Eppendorf Zentrifuge (5415 C)	Eppendorf, Bonn, Dtl.
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Dtl.
FACS Canto II	BD, Heidelberg, Dtl.
Gefrierschrank (-80 °C)	Sanyo, München, Dtl.
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Dtl.
Fluoprep	Biomerieux, Marcey-l'Etoile, Frankreich
Hettich Zentrifuge (universal 320)	Hettich, Tuttlingen, Dtl.
Hettich Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich, Tuttlingen, Dtl.
ImmEdge Stift	Vector, Peterborough, England
Kryostat	Leica, Wetzlar, Dtl.
Neon Transfection System	Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
Neon Transfection Kit 10 µl, 100 µl	Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
Roti-Histokitt II	Roth, Kalsruhe, Dtl.
Stickstofftank	Taylor-Wharton, Mildstedt, Dtl.
SuperFrost Objekträger 76 x 26 mm	Langenbrinck, Emmendingen, Dtl.
Synergy 2 (Photometer)	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, Dtl.
Zeiss-Mikroskop	Zeiss, Jena, Dtl.

## 2.7 Antikörper

**Tab. 2.1: Liste der verwendeten Antikörper**

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Firma	Verwendung	Vdg.
CD4	Maus IgG1	-	MT310	dako	Histo.	1:50
CD4	Maus IgG2b	PerCP	OKT4	BioLegend	FACS	1:100
CD14	Maus IgG2b	APC-Cy7	MphiP9	BD Bioscience	FACS	1:100
CD25	Maus IgG2b	PE	4 E3	Miltenyi	FACS	1:20
CD25	Maus IgG1	APC	M-A251	BD Bioscience	FACS	1:10

## Material

CD86	Maus IgG1	RPE	2331 (FUN-1)	BD Bioscience	FACS	1:20
CD31	Ratte IgG2a	-	MEC13.3	BD Bioscience	Histo	1:1500
CD107aa	Maus IgG1	FITC	H4A3	BD Bioscience	FACS	1:25
CD127	Maus IgG1	PE-Cy7	eBioRDR5	eBioscience	FACS	1:50
CXCL-10	Ziege IgG	-	-	R&D	Histo.	1:35
FoxP3	Ratte IgG2a	FITC	PCH101	eBioscience	FACS, Histo.	1:50
HLA I (MHC I)	Maus IgG2a	RPE	W6/32	dako	FACS: Histo.:	1:200 1:50
HLA-DR (MHC II)	Maus IgG2a	APC	G46-6	BD Bioscience	FACS	1:50
HMGB1	Hase IgG	-	-	abcam	Histo.	1:1000
RAGE	Ziege IgG	-	-	BIOLOGO	FACS: Funktionell:	1:200 1:2000
TLR2	Maus IgG1	Alexa Fluor 488	11G7	BD Bioscience	FACS	1:10
TLR4	Maus IgG2b	PE	76B357.1	abcam	FACS, Histo.	1:25
TLR4	Maus IgG2a	-	HTA125	eBioscience	Funktionell	1:50

**Tab. 2.2: Liste der verwendeten Sekundärreagenzien**

Antikörper	Konjugat	Firma	Vdg.	Reaktion mit
Hase-gegen-Ziege	Cy3	dianova	1:300	RAGE (Histo.)
Ziege-gegen-Maus	Cy3	dianova	1:300	CD4, TLR-4, (Histo.)
Esel-gegen-Hase	DyLight488	dianova	1:100	HMGB1, (Histo.)
Esel-gegen-Ziege	PE	dianova	1:100	RAGE (FACS)
Ziege-gegen-Ratte	alexa 488	molecular probes	1:100	FoxP3 (Histo.)
Esel-gegen-Ziege	HRPO	dianova	1:100	CXCL-10 (Histo.)
Hase-gegen-Ratte	HRPO	dianova	1:100	CD31 (Histo.)
Hase-gegen-Maus	HRPO	dianova	1:100	MHC-I (Histo.)

**Tab. 2.3: Liste der verwendeten Isotypen**

Isotyp	Konjugat	Firma
Maus IgG1		dako
Maus IgG1	PE-Cy7	BD Bioscience
Maus IgG1	APC	BD Bioscience
Maus IgG1	Alexa Fluor 488	BD Bioscience
Maus IgG1	PE	BD Bioscience
Maus IgG2a	-	eBioscience
Maus IgG2a	APC	BD Bioscience
Maus IgG2a	RPE	dako
Maus IgG2b	PerCP	Biolegend
Maus IgG2b	APC-Cy7	BD Bioscience

Maus IgG2b	PE	BD Bioscience
Ratte IgG2a	FITC	coulter
Hase IgG	-	santa cruz
Ziege IgG	-	dianova

## 2.8 Patientenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Blut und Gewebe von gesunden Spendern und Tumorpatienten verwendet. Eine Genehmigung hierfür liegt der Ethikkommission vor. Die Spender unterzeichneten nach Aufklärung eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Klinische Daten der Tumorpatienten, deren Proben in die Arbeit eingeflossen sind, finden sich in Tabelle 2.1.

**Tab. 2.4: Patientenmaterial**

<b>KHT</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>Serum</b>
n (%)	32 (100)	35 (100)
Larynx; n (%)	4 (12.5)	13 (37.1)
Pharynx; n (%)	20 (62.5)	19 (54.3)
Mundhöhle; n (%)	8 (25)	3 (8.6)
Mittleres Alter $\pm$ SD [Jahren]	64 $\pm$ 10	64 $\pm$ 10
Median Follow-up [Monate] (Bereich)	18 (0–41)	12 (0–30)
Geschlecht (male/female); n	29/4	29/6
Therapie		
Operation allein; n (%)	1 (3.2)	6 (17.1)
Operation + RCT; n (%)	15 (46.8)	16 (45.7)
RCT allein; n (%)	16 (50)	13 (37.2)
AJCC Klassifizierung		
I; n (%)	1 (3.2)	4 (11.4)
II; n (%)	7 (21.9)	1 (2.9)
III; n (%)	7 (21.9)	8 (22.9)
IVA; n (%)	12 (37.5)	19 (54.3)
IVB; n (%)	0 (0)	0 (0)
IVC; n (%)	5 (15.6)	3 (8.6)
Differenzierungsgrad		
1; n (%)	0 (0)	5 (14.3)
2; n (%)	26 (81.2)	26 (74.3)
3; n (%)	6 (18.8)	4 (11.4)



## 3 Methoden

### 3.1 Immunologisch-zelluläre Methoden

#### 3.1.1 Zellkultur

##### *3.1.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen*

Für die beschriebenen Versuche wurden humane Primärzellen sowie verschiedene Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden in Vollmedium Rxx10 im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

##### *3.1.1.2 Kultivierung und Passagierung von Zelllinien*

Die Zelllinien wurden in T25 oder T75 Kulturflaschen kultiviert, um einen reibungslosen Versuchseinsatz zu gewährleisten. Bei ca. 80% Wachstumskonfluenz, die mit dem Lichtmikroskop überprüft wurde, wurden die adhärenenten Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen und durch Accutase ersetzt. Nach 5 min im Brutschrank wurde im Lichtmikroskop kontrolliert, ob sich alle Zellen abgelöst hatten. Durch vorsichtiges Klopfen an den Flaschenrand konnten auch die letzten Zellen in Suspension gebracht werden. Die Zellen wurden nun bei 300 g für 7 min zentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen, mit dem Casy Counter gezählt und in eine neue Flasche eingesetzt.

##### *3.1.1.3 Zellzahlbestimmung mit dem Casy-Counter*

Die Casy Technologie ist ein softwaregestütztes Mehrkanalsystem, welches über Widerstandsmessung und Pulsflächenanalyse Zellzahl und -volumen bestimmt. Hierfür ist keine farbliche Markierung notwendig. Die Technologie unterscheidet zwischen lebenden und toten Zellen aufgrund der Membranintegrität. Eine intakte Membran wirkt hierbei als Isolator und kann den Strom nicht leiten, hingegen kann der Strom durch Poren der beschädigten Membran durchfließen. Für die Messung wird eine 1:1000-Verdünnung der Zellsuspension in CasyTon hergestellt und in das Gerät gestellt. Der Automat gibt die Zellzahl in  $1 \times 10^6$  Zellen/ml an.

#### 3.1.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen werden in einem Endvolumen von 1 ml eingefroren. Dieses setzt sich aus 60% RPMI, 30% FCS und 10% DMSO zusammen. Die Lösungen sind optimalerweise auf 4 °C vorgekühlt. Nach der Zugabe von DMSO müssen die Zellen schnellstmöglich in den Gefrierschrank überführt werden. DMSO ist bei Raumtemperatur schädlich für die Zellen, dient jedoch im gefrorenen Zustand als Frostmittel. Aus diesem Grund muss das Auftauen der Zellen schnell von statten gehen. Zu diesem Zweck werden 10 ml vorgewärmtes RPMI mit 40% FCS auf die gefrorenen Zellen gegeben und diese unter Schwenken im Wasserbad aufgetaut. Nach dem Zentrifugieren (300 g, 7 min) können die Zellen für weitere Versuche verwendet werden.

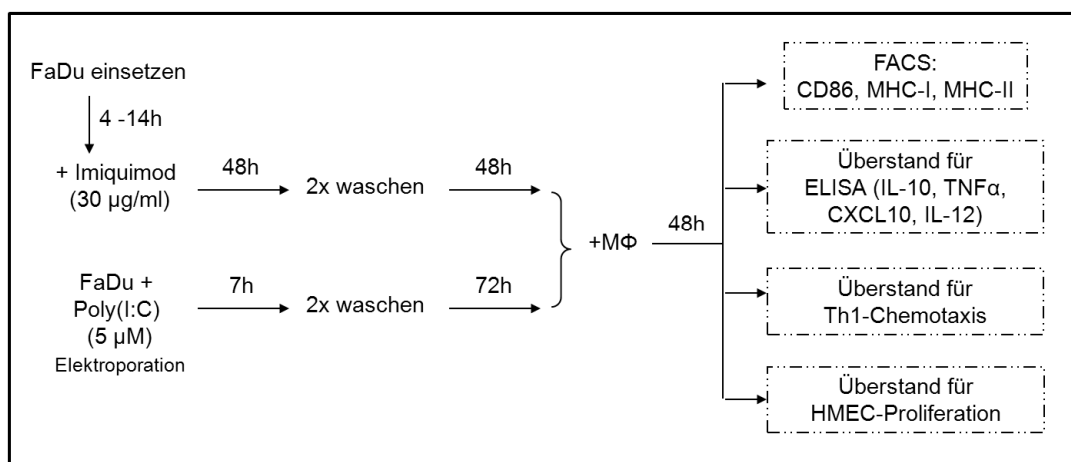
#### 3.1.1.5 Herstellung von NCS

HMGB1 ist ein sehr reaktives Molekül. Es besitzt eine basische A und B Box, sowie einen sehr aspartat- und glutamatreichen sauren C-Terminus. Mit diesen reaktiven Gruppen kann es Nukleinsäuren, Transkriptionsfaktoren, Membranproteine wie Proteoglykane, Thrombomodulin und Phospholipide binden (Urbanaviciute *et al.* 2007). Wird HMGB1 in die extrazelluläre Matrix freigesetzt liegt es demzufolge kaum als freies Molekül vor, sondern ist aufgrund seiner reaktiven Struktur in Komplexen gebunden. In der Zellkultur bedient man sich nekrotischem Zellüberstand (NCS, *necrotic cell supernatant*), um dieses natürliche HMGB1 zu mimen. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ 1ml RPMI durch dreimaliges Einfrieren (-80 °C) und Auftauen (37 °C) zerstört. Der NCS wurde durch hochturiges Zentrifugieren (4000 g, 10 min) von den zellulären Bestandteilen befreit und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Selbstverständlich befinden sich nach diesem Prozedere neben HMGB1 auch andere nukleäre und cytoplasmatische Moleküle im NCS, die ähnlich wie beim nekrotischen Zelltod in die Umgebung abgegeben werden. Vor der Verwendung wurde der pH-Wert des NCS durch Zugabe von 10 mM Hepes Puffer angepasst. Bei den T-Zell-Proliferationsansätzen wurde außerdem 10% FCS und 1% PenStrep dem NCS beigelegt.

#### 3.1.1.6 Stimulation von FaDu-Zellen

FaDu-Zellen wurden mit Imiquimod stimuliert oder mit Poly(I:C) elektroporiert. Die Transfektion erfolgte mit 1 Puls bei 1400V für 20 ms. Hierfür wurden Kapillaren und Puffer des Neon Transfection Kits verwendet. Die Zellen wurden nach der Elektroporation in RPMI,

welches mit 10% FCS aber ohne Antibiotika versetzt war, gegeben. Nach 7 Stunden wurde zweimal mit Rxx10 gewaschen (300 g, 7 min) und die Zellen wurden anschließend in Rxx10 weiter kultiviert. Auch die mit Imiquimod vorstimulierten Zellen wurden auf diese Weise bei nachfolgender Monozytenstimulation gewaschen. CD14 gemacste Monozyten wurden im Verhältnis 2:1 zu den an Tag 0 berechneten eingesetzten FaDu-Zellen gegeben und für 48 Stunden weiter kultiviert. Das Endovolumen betraf hierbei  $1 \times 10^6$  Gesamtzellzahl / 1ml. Für die Zytokinkinetik der FaDu-Zellen alleine hingegen erfolgte kein Mediumwechsel nach 7 bzw. 48 Stunden. Stimulationsschema, Waschschritte, Kokultur mit Monozyten (MΦ) und Verwendung der Zellen sowie Überstände veranschaulicht Abbildung 3.1.



**Abb. 3.1: Stimulationsschema von FaDu-Zellen**

### 3.1.1.7 Zellzahlmessung mittels MTT

Der MTT-Assay dient der Zellzahl-, genauer gesagt der Zellvitalitätsbestimmung adhärenter Zellen. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ein gelbes, membrangängiges Tetrazoliumsalz, das in einer lebenden Zelle zu blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan-Kristallen reduziert wird (Mosmann 1983). Am Tag der Messung werden die Zellen mit 250 mg/ml MTT-Lösung (verdünnt in Rxx10) für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. MTT wird in dieser Zeit aufgenommen und reduziert. Anschließend werden die Zellen vom Überstand befreit und mittels 100µl DMSO für 10 min auf dem Rotationsschüttler lysiert. Die Kristalle werden aus den Zellen freigesetzt und gehen in Lösung. Der Farbstoff kann nun mit einem Multiwell-Spektrometer (Synergy 2) colorimetrisch bei 630 nm gemessen werden. Mithilfe der optischen Dichte und der entsprechenden Kontrolle kann die Zellzahl quantifiziert werden.

### 3.1.2 Isolation und Behandlung humaner Immunzellen

#### 3.1.2.1 Dichtezentrifugation von peripherem Blut

Zur Auftrennung von Blut in Plasma, mononukleäre Zellen, Granulozyten und Erythrozyten wurde die Dichtezentrifugation verwendet. Hierfür mussten alle verwendeten Lösungen Raumtemperatur besitzen. Je nach Menge wurde das Blut in Citratröhrchen oder einer Flasche, die mit 0,94% Natriumcitrat versetzt worden war, abgenommen. Anschließend wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt. 15 ml Lymphozyten-separationsmedium (Ficoll) wurde in 50 ml Röhrchen vorgelegt und mit 30ml der Blut/PBS-Mischung vorsichtig überschichtet. Die Röhrchen wurden bei 300 g für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Zur Isolation der mononukleären Zellen (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) wurde das Plasma vorsichtig abgesaugt und anschließend die Schicht der PBMCs mit einer Einwegpasteurpipette in ein neues 50 ml Röhrchen geerntet. Die Zellen wurden 1:1 mit PBS verdünnt und gewaschen (400 g, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden weitere zwei- bis viermal mit PBS gewaschen (300 g, 10 min) bis der Überstand klar war. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in Rxx10 aufgenommen, mit dem CasyCounter gezählt und für die weiteren Versuche verwendet.

#### 3.1.2.2 Aufreinigung mittels MACS-Technologie

Die *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Technologie ermöglicht die Abtrennung einer bestimmten Zellpopulation aufgrund definierter Oberflächenmoleküle. Diese werden mit Antikörpern, an welche Magnetpartikel (Microbeads) gekoppelt sind, inkubiert und anschließend über eine Säule gegeben, welche einem starken Magnetfeld ausgesetzt ist. Nun werden alle Zellen, die magnetisch markiert wurden in der Säule gehalten. Wird die Säule dem Magnetfeld entnommen, können nun auch die zuvor festgehaltenen Zellen aus der Säule gewaschen werden.

Die einzusetzende Menge an microbeads ist von der Gesamtzellzahl abhängig. Sollten Lymphozyten aufgetrennt werden, wurden Monozyten zunächst aufgrund ihrer Plastikadhärenz abgetrennt. Hierfür wurde die Zellzahl der PBMCs auf  $2 \times 10^6$  Monozyten/ml eingestellt, in eine Kulturflasche überführt und für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Die sich in Suspension befindenden Lymphozyten wurden geerntet, gezählt, abzentrifugiert und in MACS-Puffer aufgenommen. Die adhärenzten Monozyten konnten mit Rxx10 bedeckt werden und für weitere Versuche verwendet werden.

Zur Isolation von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten aus  $1 \times 10^7$  Zellen wurden diese in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 20 µl CD4 Microbeads für 15 min inkubiert. Bei größerer Zellzahl wurde hochskaliert. Nach einem Waschschrift wurden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten über eine LS-Säule positiv selektioniert.

Zur Isolation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs wurde die Zellsuspension zunächst mit Antikörpern gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ und CD235a inkubiert, um CD4<sup>+</sup> Lymphozyten negativ zu selektieren. Hierfür wurde eine LD-Säule verwendet. Diese wurde entgegen der Herstellerangabe nicht nur zweimal, sondern dreimal gewaschen. Anschließend wurden die isolierten T-Zellen mithilfe von CD25 Microbeads in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teffs mithilfe von 2 MS-Säulen aufgetrennt.

Zur negativen Depletion von NK-Zellen wurde die Zellsuspension mit einem Cocktail aus Antikörpern inkubiert, die nur gegen Antigene gerichtet waren, die nicht von NK-Zellen exprimiert werden. Eine reine NK-Zellpopulation wurde über eine LS-Säule negativ selektioniert.

Monozyten konnten mithilfe von CD14 microbeads positiv selektioniert werden. In diesem Fall wurde keine Plastikadhärenz vor der MACS-Isolation durchgeführt.

Die Reinheit der isolierten Populationen wurde regelmäßig überprüft und lag zwischen 90 und 98%.

### *3.1.2.3 T-Zellstimulation und -proliferation*

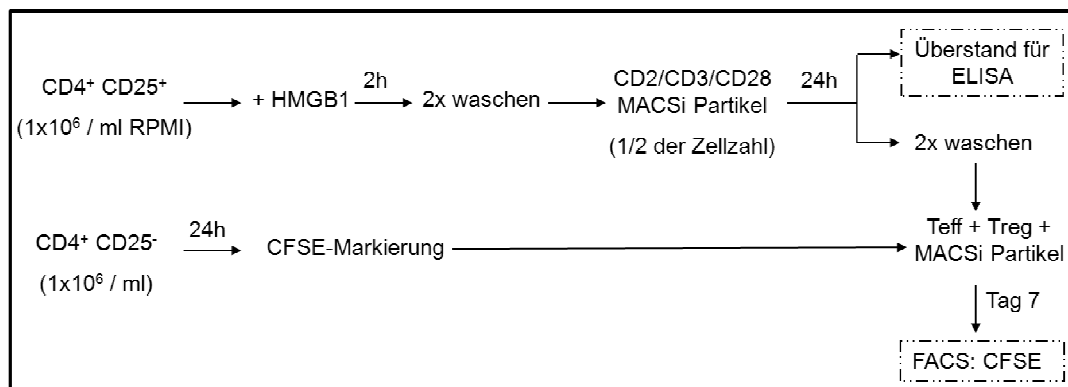
Zur durchflusszytometrischen Messung der T-Zellproliferation werden die T-Lymphozyten mit dem nicht fluoreszierenden Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE) markiert. Dieses permeabilisiert in die Zelle, wo intrazelluläre Esterasen die Acetat-Gruppe abspalten. Es entsteht der fluoreszierende Carboxy-Fluorescein-Succinimidylester, der sich aufgrund seines Esters mit Amingruppen cytoplasmatischer Proteine verankert. Teilt sich die Mutterzelle wird der Farbstoff zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen aufgeteilt und verdünnt sich somit von Zellteilung zu Zellteilung.

Bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen werden in 1 ml RPMI mit 5 µM CFSE für 15 min im Wasserbad inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird 1 ml FCS hinzugegeben. Die Zellen werden zweimal mit Vollmedium gewaschen, gezählt und können in den Versuch eingesetzt werden.

Die Zellproliferation wird mit Hilfe von CD2/CD3/CD28 MACSi Partikeln (Treg Suppression Inspector von Miltenyi) gemäß des Beipackzettels induziert, sodass ein Partikel:Zell-Verhältnis von 1:1 besteht.

Bei der reinen T-Zellproliferation werden  $5 \times 10^4$   $CD4^+CD25^-$  Teffs in 200  $\mu$ l Rxx10 inkubiert und über 7 Tage im Brutschrank kultiviert. HMGB1 wurde an Tag 0 in verschiedenen Konzentrationen dem Ansatz hinzugefügt. In manchen Ansätzen wurden Antikörper gegen TLR4 oder RAGE 20 min vor Zugabe von HMGB1 hinzugegeben. In manchen Ansätzen wurden  $CD4^+CD25^-$  Lymphozyten in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in NCS, supplementiert mit 10% FCS und 1% PenStrep, resuspendiert und ebenfalls mit MACSi Partikeln stimuliert und inkubiert. Am letzten Tag wurde der Überstand abgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  für eine spätere ELISA-Untersuchung eingefroren.

Für Suppressionsassays wurden  $CD4^+CD25^-$  Teffs zusammen mit  $CD4^+CD25^+$  Tregs kultiviert. Hierfür wurden Tregs in RPMI mit HMGB1 vorstimuliert, mit Rxx10 gewaschen, mit MACSi Partikeln über Nacht in Rxx10 aktiviert (Partikel:Zell-Verhältnis von 1:2), erneut mit Rxx10 gewaschen und mit Teff und Partikeln zusammen über 7-8 Tage inkubiert (Abb. 3.2). In diesem Fall wurde die Menge an MACSi Partikeln auf die Gesamtzahl der T-Lymphozyten berechnet.



**Abb. 3.2: Stimulationsschema für den Suppressionsassay**

Am Tag der Messung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und unmittelbar am Canto II aufgenommen. Die Analyse erfolgte mittels der ModFit LT 3.2 Software. Hierbei wird ein Proliferationsindex ermittelt, der direkt proportional der T-Zell-Proliferation ist. Die Proliferation der T-Zellen, die ohne Zusätze erfolgte wird als 100% erachtet. In Suppressionsansätzen wird der Index auf 100% gesetzt, bei dem Teffs mit basisstimulierten Tregs inkubiert wurden.

#### 3.1.2.4 Leukozytenisolation aus Tumorgewebe

Zur Isololation tumorinfiltrierender Leukozyten (TIL) aus humanem Tumorgewebe wurde der gentleMACS Dissociator zusammen mit dem Tumor Dissociation Kit von Miltenyi Biotec

vewerndet. Hierfür wurde zunächst das Tumorgewebe in 2-4 mm große Stücke zerkleinert und anschließend in ein gentleMACS C Tube überführt, das folgenden Enzymmix enthielt: 100 µl Lösung 1, 500 µl Lösung 2, 25 µl Lösung 3 in 4.4 ml RPMI. Es folgten 2 Mischschritte im gentleMACS, die von 30-minütiger Inkubation bei 37 °C begleitet wurden. Nach dem dritten Mischschritt wurde die Zellsuspension durch einen Filter der Porengröße 100 µm gegeben. Die dissoziierten Zellen konnten nun für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt werden.

#### *3.1.2.5 In vitro Generierung von Th1-Zellen*

Zur Generierung von Th1-Zellen wurden CD4-Lymphozyten mittels MACS-Technologie aus PBMCs gesunder Spender isoliert. Die aufgereinigten Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Rxx10 resuspendiert und in eine 6-well Platte gegeben. Der Kultur wurden PHA (2 µg/ml), IL-2 (20 IU/ml) und IL-12 (2 ng/ml) zugesetzt. Alle 3 oder 4 Tage erfolgte ein halber Mediumwechsel. Die Zellen konnten von Tag 7 – 10 verwendet werden. Die Polarisierung in Richtung Th1-Zellen wurde anhand der Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 durchflusszytometrisch überprüft.

### **3.1.3 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie dient der relativen Quantifizierung bestimmter Zellen und Antigene innerhalb einer Zellsuspension. Das Gerät generiert einen Einzelzellstrahl, in dem jede Zelle separat von einem oder mehreren Lasern erfasst wird. Die gestreuten Lichtstrahlen werden von verschiedenen Detektoren erfasst und definieren Zellgröße (forward scatter, FSC) und Zellgranularität (sideward scatter, SSC). Zusätzlich werden Antikörper verwendet, die definierte Strukturen auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren erkennen. Die Antikörper werden mit fluoreszierenden Molekülen gekoppelt, die von Lasern entsprechender Wellenlänge angeregt werden. Emittiertes Licht wird von Detektoren erfasst und in eine Signalstärke umgewandelt. Für die Analysen in dieser Arbeit wurde das 6-Farben-Durchflusszytometer (FACS) Canto II zusammen mit der DIVA6 Software von Becton Dickinson verwendet.

### *3.1.3.1 Oberflächenfärbung*

Zur Oberflächenfärbung wurden  $5 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l Azid-PBS resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 min bei 4 °C im Dunkeln mit den Antikörpern inkubiert. Nur bei Färbungen mit RAGE (BIOLOGO) wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper sind in den Tabellen 2.1 – 2.3 zusammengefasst. Waren die Antikörper unkonjugiert, wurde nach einem Waschschrift ein zweiter Färbeschrift mit fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern angeschlossen. Anschließend wurden die Zellen sofort am Canto II aufgenommen oder aber einer Permeabilisierung, für eine intrazelluläre Färbung, zugeführt.

### *3.1.3.2 Intrazelluläre Färbung*

Zur Detektion intrazellulärer Strukturen wie z.B. dem Transkriptionsfaktor FoxP3, mussten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Zu diesem Zweck wurde das FoxP3 Staining Buffer Set sowie der FITC-konjugierte FoxP3-Antikörper von eBioscience, Frankfurt, Dtl., verwendet. Nach der Färbung und dem finalen Waschschrift wurden die Zellen unverzüglich am Canto II aufgenommen.

### *3.1.3.3 Annexin-V/ 7-AAD-Färbung*

Zur durchflusszytometrischen Analyse toter Zellen wurde das Annexin-V Apoptosis Detection Kit von BD Bioscience, Heidelberg, Dtl., verwendet. Phosphatidyl-Reste sind ein Bestandteil der zytosolischen Zellmembran. Im Laufe des programmierten Zelltods (Apoptose) werden diese Reste auf die Membranaußenseite transloziert, wo sie calciumabhängig von Annexin-V gebunden werden können. Zu diesem Zeitpunkt ist die Membranintegrität noch nicht beeinflusst. Bilden sich jedoch im Laufe der Apoptose oder Nekrose Poren in der Membran, kann zu diesem Zeitpunkt auch 7-Aminoactinomycin (7-AAD) in die Zelle eindringen. Im Zellkern interkaliert es in die DNA zwischen Cytosin und Guanin und emittiert rotes Licht.

Sollen adhärenente Zellen gefärbt werden, muss darauf geachtet werden, dass sich diese im Laufe des Absterbens vom Boden lösen und in Suspension gehen. In diesem Fall müssen also immer sowohl die schwimmenden Zellen, als auch die adhärenenten Zellen unter Einsatz von Accutase der Färbung zugeführt werden. Die Zellen wurden in 50  $\mu$ l Annexin Binding Buffer resuspendiert und mit Annexin-V-PE (1:50) sowie 7-AAD (1:100) für 15 min im Dunkeln bei



Raumtemperatur inkubiert. Es folgte kein Waschschrift. Stattdessen wurde 150 µl Annexin Binding Buffer zur Zellsuspension gegeben, diese gevortex und unverzüglich der Messung am Canto II unterzogen.

#### 3.1.3.4 CD107a Degranulationsmessung

CD107a, auch bekannt als LAMP-1 (*lysosomal-associated membrane protein-1*), dient als Marker der Degranulation von NK- und CD8 T-Zellen. Es ist in der Membran von Lysosomen und Endosomen lokalisiert. Werden die Vesikel zur Außenmembran transportiert und wird deren Inhalt nach außen abgegeben, ist CD107a vorübergehend auf der Zelloberfläche lokalisiert. Zur Stabilisierung dieses Zustandes und Verstärkung des Signals wird ein Golgi-Stopp wie Monensin verwendet.

FaDu-Zellen wurden für 72 Stunden mit 30 µg/ml Imiquimod stimuliert oder mit 5 µM Poly(I:C) elektroporiert und für weitere 72 Stunden kultiviert. Für den Degranulationsassay wurden lebende und tote Zellen geerntet und mithilfe des CasyCounter gezählt. NK-Zellen gesunder Spender wurden im Verhältnis 1:1 zu den FaDu-Zellen gegeben, berechnet auf lebende FaDu-Zellen. Bei einer nachgeschalteten Kontrolle wurde festgestellt, dass Annexin-V-positive FaDu-Zellen noch als lebend im CasyCounter erfasst worden waren. Aus diesem Grund wurde in den Ansätzen, in denen 50% der Zellen durch PRR-Liganden abgestorben waren, die doppelte Menge der gezählten FaDu-Zellen eingesetzt. Eine direkte zusätzliche Kontrollmessung im Canto II zeigte ein 1:1 Verhältnis lebender FaDu-Zellen und NK-Zellen. Zu der Mischung ( $5 \times 10^4$  NK- plus  $5 \times 10^4$  FaDu-Zellen/ 100µl Rxx10) wurde direkt FITC-konjugierter CD107a-Antikörper im Verhältnis 1:25 dazugegeben. Nach 1 Stunde wurde Monensin im Verhältnis 1:600 hinzugefügt. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und im Canto II analysiert. Im FSC/SSC-Plot wurde ein Gate auf die NK-Zellen gesetzt, die sich aufgrund ihrer Größe und Granularität deutlich von FaDu-Zellen unterschieden. Anschließend wurde der Anteil CD107a<sup>+</sup> Zellen ermittelt.

#### 3.1.4 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur Quantifizierung von Zytokinen und generell Proteinen in Lösung, z.B. in Zellkulturüberständen.

Hierzu wird zunächst eine 96-well Mikrotiterplatte mit einem Antikörper beschichtet. Anschließend wird die Lösung auf der Platte inkubiert, sodass das Protein vom Antikörper

gebunden werden kann. Die übrigen Bestandteile werden abgewaschen. Nun folgt ein weiterer Inkubationsschritt mit einem anderen zielgerichteten Antikörper, der selbst mit Biotin gekoppelt ist. An dieses kann nun Streptavidin, welches mit Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiert ist, mit äußerst hoher Affinität binden. Nun wird das mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  versetzte Substrat 3,3',5,5"-Tetramethylbenzidin (TMB) aufgetragen. Die Peroxidase spaltet  $\text{H}_2\text{O}_2$  in OH-Radikale, welche dem TMB ein Elektron entziehen. Das TMB-Radikalkation besitzt eine blaue Farbe. Durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure wird das Enzym denaturiert, was die Reaktion abstoppt. Außerdem färbt sich durch Protonierung das TMB-Radikal gelb. Die colorimetrische Detektion erfolgt bei 450 nm. Wegen des sandwichartigen Aufbaus wird dieser ELISA auch Sandwich-ELISA genannt. Eine Standardreihe dient der Quantifizierung.

Die ELISAs zur Detektion von HMGB1 (IBL, Hamburg, Dtl.),  $\text{IFN}\gamma$ , IL-12p70,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$  (alle R&D Systems, Wiesbaden, Dtl.) sowie IL-10 und CXCL-10 (beide BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.) wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.1.5 HEK blue I IFN $\alpha/\beta$

Die Zelllinie HEK blue I IFN  $\alpha/\beta$  ist eine gentechnisch modifizierte Zelllinie, in welcher durch Typ I IFN der JAK-STAT-Signalweg angeschaltet wird. Auf Aktivierung hin kommt es zur Expression des Reportergens SEAP (*secreted embryonic alkaline phosphatase*). SEAP wird in den Überstand sezerniert. Das hinzugefügte Quanti-Blue Medium verfärbt sich in Anwesenheit von SEAP von rosa nach blau und kann photometrisch nachgewiesen werden.

Das Protokoll wurde wie folgt durchgeführt:

#### Tag 1:

- HEK-Blue ablösen und auf eine Zellkonzentration von  $0,28 \times 10^6/\text{ml}$  einstellen
- 20  $\mu\text{l}$  Probe pro well in eine 96 well –Flachbodenplatte pipettieren
- 180  $\mu\text{l}$  Zellsuspension / well pipettieren
- Für 20-24h im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$  inkubieren

#### Tag 2:

Ein Beutel Quanti-Blue mit 100ml Braun Wasser lösen und steril filtern

SEAP Nachweis:

- 10  $\mu\text{l}$  induzierter HEK-Blue IFN $\alpha/\beta$  Überstand in ein well einer 96 well – Flachbodenplatte pipettieren
- 90  $\mu\text{l}$  Quanti-Blue dazu pipettieren
- 1-3 Std im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$  inkubieren
- SEAP-Levels im Syngery bei 620-655nm messen

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RNA Isolation und reverse Transkription

Zur Isolation von RNA aus KHT-Gewebe wurde das RNeasy Mini Kit von Quiagen (Hilden, Dtl.) gemäß Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde 20-30 mg KHT-Gewebe in RNAlater Stabilisierungslösung gegeben und getrocknet bei -80°C gelagert. Das gefrorene Material wurde zu Puder zerkleinert und in 350 µl RLT Puffer lysiert, anschließend filtriert, mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol gemischt und auf die Säule gegeben. Nach drei Waschschritten konnte reine RNA mit Wasser eluiert werden. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Photometer Synergy 2 bestimmt. Anschließend wurden 200ng RNA mit dem SuperScript II RNase H<sub>-</sub> Reverse Transcriptase kit von Invitrogen gemäß Herstellerangaben unter Verwendung von OligodT bei 65°C für 5 min in 20 µl Reaktionslösung umgeschrieben. Nicht-maligne Mukosa von drei Spendern wurde als gesunde Kontrolle verwendet. Diese wurden wie oben beschrieben prozessiert und in gleichen Teilen zu einer Probe zusammengemischt. Diese Schritte wurden von Xiang Gu durchgeführt.

### 3.2.2 Semiquantitative PCR

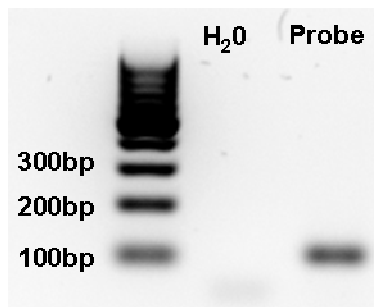
Zur Konzentrationsbestimmung der Genexpression wurde die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR für *real time quantitative polymerase chain reaction*) verwendet. Bei dieser Methode interkaliert ein Fluoreszenzfarbstoff in die doppelsträngige DNA. Steigt pro Zyklus die Menge des replizierten Gens steigt direkt proportional dazu auch die Fluoreszenz. Die Quantifizierung wird relativ zu einem *housekeeping* Gen wie β-Actin berechnet.

Die Messung wurde mithilfe des DyNAmo Capillary SYBR Green qPCR Kit von Biocat und dem Light Cycler von Roche durchgeführt. Bedingungen der Reaktion waren: hot-start Enzymaktivierung (95°C, 10 min), 40 – 50 Denaturierungszyklen (95°C, 10 min), Annealing (55°C für β-Actin und 61°C für HMGB1, 20 sec) und Extension (72°C, 15 sec). Als Primer wurden verwendet: β-Actin F-5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3', R-5'-GGGTACATGGTGGTGCCG-3', HMGB1 F-5'-CTCAGAGAGGTGGAAGACCATGT-3', R-5'-GGGATATAGGTTTTCTCTTTTC-3'. Mit Hilfe der *crossing points* ( $C_T$  = *Threshold cycle*) kann nach folgender Formel von Livak et al (Livak and Schmittgen 2001) die Menge berechnet werden:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{Ziel}} - C_{T, \text{Actin}})_{\text{Zeit x}} - (C_{T, \text{Ziel}} - C_{T, \text{Actin}})_{\text{Zeit 0}}$$

$$\text{Menge des Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

### 3.2.3 Gelelektrophorese



Die Produkte aus der qPCR wurden auf ihre Korrektheit hin mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht. Hierfür wurde ein 2%-iges Agarosegel mit TAE und 0.001% einer 10%-igen Ethidiumbromidlösung hergestellt. 10 µl der Proben wurden mit 2 µl 1x Agarosegel loading buffer versetzt und aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 90V angelegt. Nach 45 min wurde das Gel am BIODOC-IT M26X UV-basiert analysiert und fotografiert. Die HMGB1-Primer liefern ein spezifisches Produkt bei der Amplikongröße von 105 Basenpaaren (bp).

## 3.3 Histologische Methoden

### 3.3.1 Einfrieren von Tumorgewebe und Herstellung von Gefrierschnitten

Tumorgewebe wurde für den Transport aus dem Operationssaal in das Labor in Ringerlösung gegeben. Anschließend konnte das Gewebe bei Bedarf zugeschnitten und in Tissue Tek Cryomold Einweg-Vinylformen mit Tissue Tek O.C.T. eingebettet werden. Die Proben wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten wurden aus den Gewebeblöcken bei -21 °C 5 µm dicke Schnitte gefertigt, die auf Super-Frost Plus Objektträger aufgelegt wurden. Wurde malignes Gewebe anhand einer Hämatoxilin/Eosin (HE)-Färbung bestätigt, wurden mehrere Schnitte angefertigt und diese bei -80 °C bis zur Fluoreszenzfärbung gelagert.

### 3.3.2 Hämatoxilin/Eosin (HE-) Färbung

Bei der HE-Färbung entstehen zwei Farben: das zu Hämaun oxidierte Hämatoxilin färbt alle sauren Strukturen wie Nukleinsäuren blau; Eosin lässt alle basische Strukturen wie die Mehrzahl der cytoplasmatischen Proteine rot erscheinen. Auf diese Weise können das Kern/Plasma-Verhältnis und die Homogenität der Zellkerne untereinander analysiert werden, welches wichtige Parameter zur Erfassung der Malignität von Zellen darstellt.

Bei der HE-Färbung wird der Schnitt in folgender zeitlicher Abfolge in die genannten Lösungen gebracht: 5 min in 96% Ethanol, 2 min in 70% Ethanol, 10 sec in destilliertes Wasser, 20 sec in gefiltertes Hämatoxilin, 10 min unter fließendes Leitungswasser, 3 min in gefiltertes Eosin plus einiger Tropfen Essigsäure, ca. 1 min in 70% Ethanol, ca. 1 min in 96%

Ethanol, 10 sec in Isopropanol, zweimal je 5 min in Xylol. Der Schnitt kann nun in Roth Histokit II eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop analysiert werden.

### 3.3.3 Kolorimetrische Färbung

Zur kolorimetrischen Darstellung von Proteinen auf Gefrierschnitten wurden folgende Schritte durchgeführt: Auftauen, Fixierung, Peroxidase-Block (10min), Blockierung und Hintergrundreduzierung, Inkubation des primären Antikörpers (1° AK), Inkubation eines sekundären Antikörper (2° AK), Entwicklung mit AEC Solution für 10min (Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.), Kernfärbung mit filtriertem Hämalaun (20 sec), Bläuen unter fließendem Leitungswasser und Eindecken mit Kaiser's Glycerin, das bei 56 °C verflüssigt wurde. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten Waschschrte. Die Färbekonditionen sind entsprechend der Antikörper in den Tabellen 2.1 – 2.3 aufgelistet. Tabelle 3.1 verschafft einen Überblick über die Details der Färbeprotokolle.

**Tab. 3.1: Immunhistochemisches Färbeprotokoll**

<b>CD31</b>		
Fixierung	30 min BD Cytofix/Cytoperm	
Blockierung	-	
1° AK	60 min in TBS + 10%FCS, 10%HS	
2° AK	30 min in TBS + 10%FCS, 10%HS	
<b>CXCL-10</b>		
Fixierung	30 min BD Cytofix/Cytoperm	
Blockierung	30 min in TBS + 10% FCS, 0,3% Triton	
1° AK	1 Std. in Permwash Buffer (BD) + 10% FCS	
2° AK	30 min in TBS + 10% FCS	
<b>HMGB1</b>		
Fixierung	20 min in 3% PFA	
	30 min in PBS + 1% BSA, 5% Ziegenserum, 0.1% Tween	
Blockierung		
1° AK	über Nacht bei 4 °C in PBS + 10% HS, 10% MS	
2° AK	30 min in PBS+10%MS	
<b>MHC-I</b>		
Fixierung	30 min BD Cytofix/Cytoperm	
Blockierung	30 min TBS + 5% Kaninchenserum	
1° AK	1 Std. in TBS + 5% Kaninchenserum	
2° AK	30 min in TBS + 5% Kaninchenserum	

Bei der Kontrollfärbung wurde der primäre Antikörper (1° AK) weggelassen. Bei manchen Schritten wurde das BD Cytfix/Cytoperm Kit von BD Pharmingen (Heidelberg, Dtl.) verwendet. Tabelle 3.1 verschafft einen Überblick über die Details der Färbeprotokolle.

### 3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Proteinen auf Gefrierschnitten wurden folgende Schritte durchgeführt: Auftauen, Fixierung, Blockierung und Hintergrundreduzierung, Inkubation des primären Antikörpers, Inkubation des sekundären Antikörpers teilweise zusammen mit 7-AAD zur Kernfärbung (1:400).

Nähere Informationen zu den verwendeten Antikörpern (Firma, Verdünnung) sind in Tabellen 2.1 – 2.3 aufgelistet.

**Tab. 3.2: Fluoreszenzmikroskopisches Färbeprotokoll**

<b>HMGB1</b>		
Fixierung	10 min in 3% PFA	
	1 Std. in PBS + 1% BSA, 10% Ziegenerum, 0.1%	
Blockierung	Tween	
	über Nacht bei 4 °C in PBS + 1% BSA, 10%	
1° AK	Ziegenerum	
2° AK	30 min in PBS + 1% BSA	
<b>CD4, FoxP3, RAGE, TLR4</b>		
Fixierung	10 min in 3% PFA	
Blockierung	1 Std. in PBS + 5% BSA, 0.2% Triton	
1° AK	über Nacht bei 4 °C in PBS + 10% FCS, 20% HS	
2° AK	30 min in PBS + 10% FCS	

Zur Kontrolle wurde eine Isotypfärbung durchgeführt. Hierbei diente DRAQ5 (eBioscience, Frankfurt, Dtl.) der Visualisierung der Zellkerne (1:1000). Tabelle 3.2 verschafft einen Überblick über die Details der Färbeprotokolle.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von toten Zellen wurde eine TUNEL-Färbung mit dem APO-DIRECT Kit (BD Pharmingen) durchgeführt. Als Kontrolle wurde die *Staining Solution* ohne TdT Enzym angesetzt. Das Färbeprotokoll wurde hierbei wie folgt für die Histologie angepasst:

30 min Fixierung mit 3% PFA, 3x waschen mit PBS  
15 min Fixierung in 70% Ethanol, 3x waschen mit PBS  
3x 5 min in *Wash Buffer* inkubieren  
60 min in *Staining Solution* bei 37 °C im Dunkeln inkubieren, Abschütteln  
5 min mit 1 Tropfen *Rinse Buffer* inkubieren  
20 min mit 1 Tropfen *Rinse Buffer* + 7-AAD (1:400) im Dunkeln inkubieren, 2x mit PBS waschen  
Mit Fluoprep eindecken

### 3.4 Tierversuche

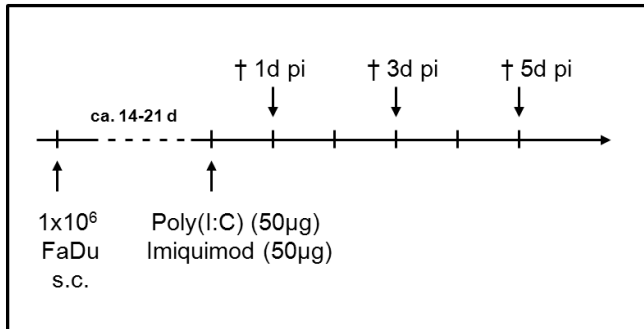
#### 3.4.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 4 – 6 Wochen alte athymische Nacktmäuse (nu/nu) verwendet. Die Tiere wurden in der tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und unter spezifischen pathogenfreien (SPF-) Bedingungen in Typ III-Käfigen mit Filterhaube gehalten. Sie erhielten Zuchtfutter (Sniff) und unterlagen einem 12-Stunden Tag-/Nacht-Rhythmus.

Die Versuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt und wurden entsprechend der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät Essen durchgeführt.

#### 3.4.2 Therapieschema

$1 \times 10^6$  FaDu-Zellen resuspendiert in 100  $\mu$ l PBS wurden dorsal in Nacktmäuse injiziert. Das Tumorstadium wurde regelmäßig kontrolliert. Die Tumorstöße wurde mit einem Messschieber festgestellt. Hatte ein Tumor die Größe von 5x5 mm oder 4x6 mm erreicht, wurde die Maus therapiert. Hierzu wurden 50  $\mu$ g Imiquimod oder 50  $\mu$ g Poly(I:C) gelöst in 50  $\mu$ l PBS intratumoral appliziert. Als Kontrolle wurde reines PBS gespritzt. Die Mäuse wurden einen Tag, drei oder fünf Tage nach Injektion mit Isofluran euthanasiert. Die Eingriffe und Behandlungen wurden von Kirsten Bruderek durchgeführt. Der Tumor wurde explantiert und wie unter Kapitel 3.3 eingefroren, geschnitten und gefärbt. In jeder Therapiegruppe befanden sich drei Mäuse, in den Kontrollgruppen jeweils eine Maus. Abbildung 3.3 verdeutlicht das Therapieschema.



**Abb. 3.3: Therapieschema Tierversuch**

### 3.5 Statistische Analysen

Bei Ergebnissen aus Stimulationsversuchen wurde der Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels zweiseitigem Student's t-Test. Bei nicht-normalverteilten Werten, wie z.B der Rezeptorexpression wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Zur Darstellung wurden teilweise Boxplots gewählt. Diese zeigen Median, Interquartilsrange (25%, 75%) sowie Maximalwerte. Die Signifikanzschwelle wurde mit  $p < 0.05$  festgelegt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von Poly(I:C) und Imiquimod auf die immunologische Tumor-Wirt-Interaktion

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein neuer Effektorarm der synthetischen PRR-Liganden Poly(I:C) und Imiquimod untersucht werden, die klassischerweise als Immunmodulatoren zum Einsatz kommen. Diese synthetischen Liganden können nicht nur auf Immunzellen wirken, sondern auch Tumorzelltod hervorrufen. Inwieweit tote Zellen eine Immunantwort induzieren ist, wie in der Einleitung erklärt, von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Wahl der Therapeutika spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

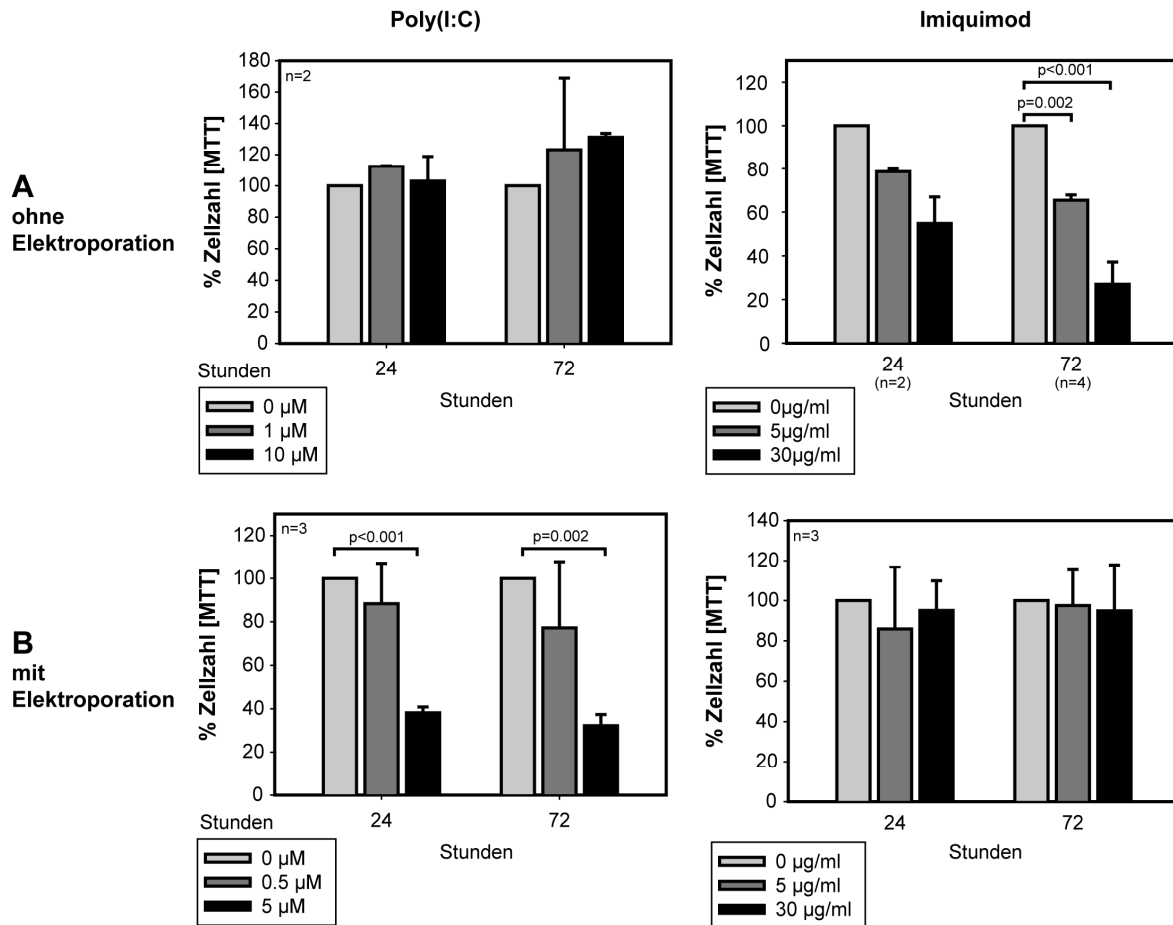
Ziel in diesem Projektpart war es, den Einfluss von Poly(I:C) und Imiquimod auf die immunologische Tumor-Wirt-Interaktion zu untersuchen.

#### 4.1.1 Gegenläufige Effekte von Poly(I:C) und Imiquimod auf die KHT-Zelllinie FaDu

Zunächst sollte der Einfluss der PRR-Liganden auf die KHT-Zelllinie FaDu genauer charakterisiert werden.

##### *4.1.1.1 Tumorzellzahl*

In einem ersten Schritt musste analysiert werden, welche Konzentrationen von Poly(I:C) und Imiquimod unter welchen Kulturbedingungen zu einer Reduktion der Tumorzellzahl führten. Es wurden zwei Arten der Stoffaufnahme verglichen: befindet sich eine Substanz im umliegenden Medium der Zelle, kann die Zelle diese mittels Endozytose aufnehmen. Die im Vesikel verpackte Substanz kann sodann von Rezeptoren wie TLR3 und TLR7, die am ER gebunden sind, erkannt werden. Da Poly(I:C) auch von den cytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA5 erkannt werden kann, musste auch diese Art der Erkennung in die Untersuchung mit eingeschlossen werden. Hierfür wurde die Elektroporation verwendet. Es stellte sich heraus, dass durch Endozytose aufgenommenes Poly(I:C) zu keiner Reduktion der Zellzahl führte, sondern eher eine leichte Erhöhung bewirkte (Abb. 4.1 A). Die Anreicherung von Poly(I:C) im Zytosol hingegen führte zeit- und dosisabhängig zu einer Reduktion der Zellzahl (Abb. 4.1 B). Bei Imiquimod wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet (Abb. 4.1 A und B). Nicht durch Elektroporation, sondern lediglich durch Zugabe ins Medium kam es zeit- und dosisabhängig zu einer verminderten Zellzahl.



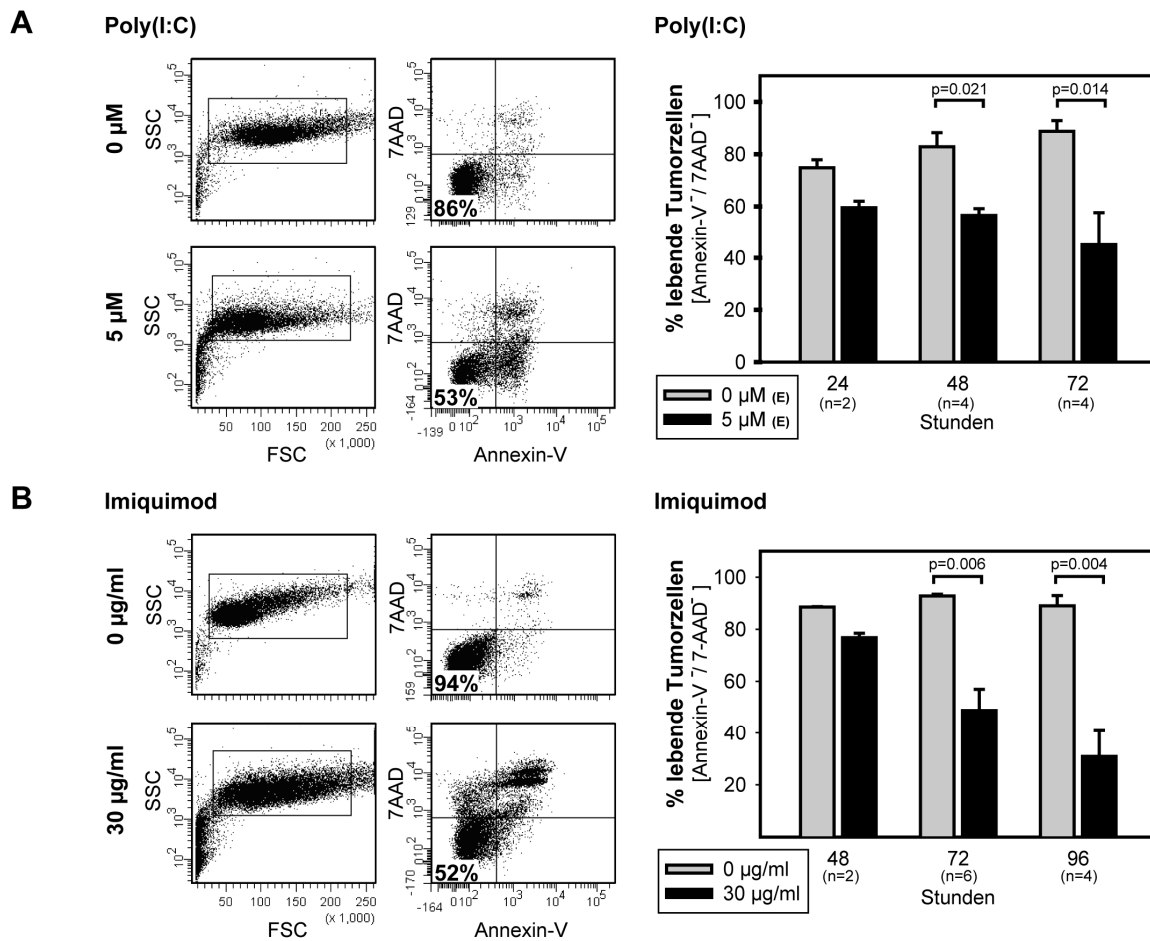
**Abb. 4.1: Poly(I:C) und Imiquimod reduzieren Zellzahl der KHT-Zelllinie FaDu.** (A) FaDu-Zellen wurden in Gegenwart der PRR-Liganden in angegebener Konzentration für 24 und 72 Std. kultiviert. (B) Poly(I:C) und Imiquimod wurde mittels Elektroporation in angegebener Konzentration in das Cytosol transportiert. Anschließend wurden die FaDu-Zellen für 24 und 72 Std. kultiviert. Die Zellzahl wurde mittels MTT bestimmt (A,B). Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test).

Diese Ergebnisse sind essentiell: in allen nachfolgenden Experimenten wurde daher Poly(I:C) immer über Elektroporation in die Zelle transportiert, während Imiquimod extrazellulär der Kultur hinzugefügt wurde.

#### 4.1.1.2 Tumorzelltod

In einem nächsten Schritt sollte mittels Annexin-V/ 7-AAD-Färbung analysiert werden, ob die PRR-Liganden zum Zelltod der Tumorzellen führten oder lediglich einen Proliferationsstopp bewirkten. Hierfür wurden die Konzentrationen verwendet, die zuvor die stärkste Reduktion der Zellzahl bewirkt hatten: 5 µM Poly(I:C) und 30 µg/ml Imiquimod. Erneut wurde Imiquimod mit den Tumorzellen über den angegebenen Zeitraum kultiviert, während Poly(I:C) durch Elektroporation in die Zellen gelangte. Poly(I:C) führte bereits nach

24 Stunden zu einer Reduktion lebender Tumorzellen in der Kultur, die durch längere Kultivierung kaum zu steigern war (Abb. 4.2 A). Imiquimod hingegen erhöhte durch längere Inkubationsdauer den Anteil toter Tumorzellen in der Kultur (Abb. 4.2 B).



**Abb. 4.2: Poly(I:C) und Imiquimod induzieren Zelltod in Tumorzellen.** FaDu-Zellen wurden mit Poly(I:C) transfiziert (A) oder mit Imiquimod kultiviert (B). Mittels Annexin-V/7-AAD-Färbung wurde der Anteil toter Zellen innerhalb der Gesamtpopulation aus adhärenen und schwimmenden Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment sowie der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test).

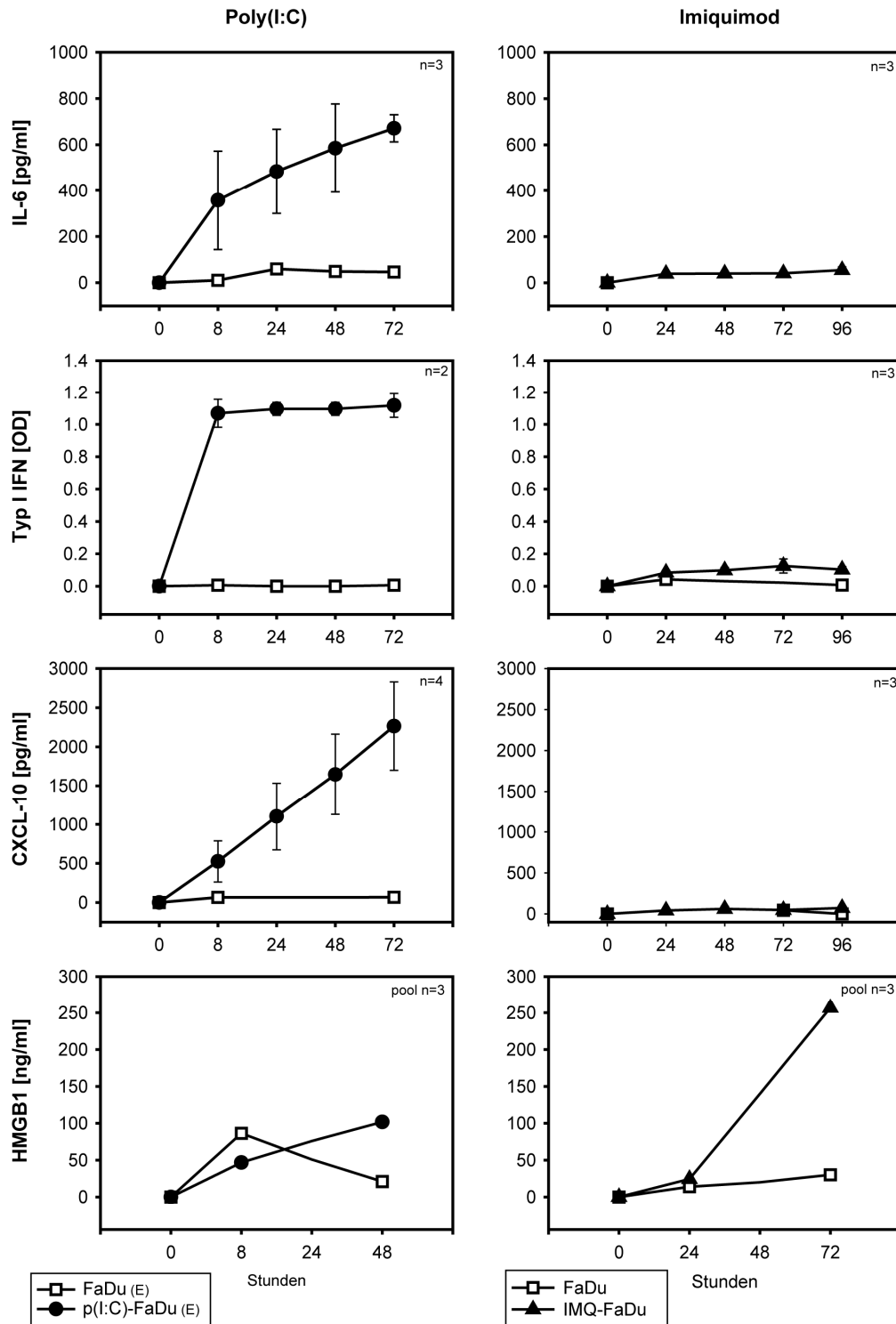
Die nach Poly(I:C)- und Imiquimod-Behandlung beobachtete reduzierte Zellzahl ist demnach auf eine erhöhte Sterberate der Tumorzellen zurückzuführen.

#### 4.1.1.3 Zytokinausschüttung

Im nächsten Schritt standen Art und Menge der durch Poly(I:C) und Imiquimod hervorgerufenen Zytokinsekretion im Focus. Hierbei zeigten sich funktionell erste deutliche Unterschiede. Poly(I:C)-Stimulation führte zeitlich linear zu einer Freisetzung von IL-6, CXCL-10 und des Kernproteins HMGB1 (Abb. 4.3). Typ I IFN wurden sehr viel schneller sezerniert und erreichten bereits nach 8 Stunden ihr Maximum in der Kultur.

Interessanterweise konnte im Überstand Imiquimod-behandelter Zellen keines der genannten Zytokine nachgewiesen werden. Einzig HMGB1 konnte detektiert werden. Die Konzentration überstieg deutlich die durch Poly(I:C)-induzierte Freisetzung. IL-10, IL-12, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  konnten nicht in den Überständen gemessen werden.

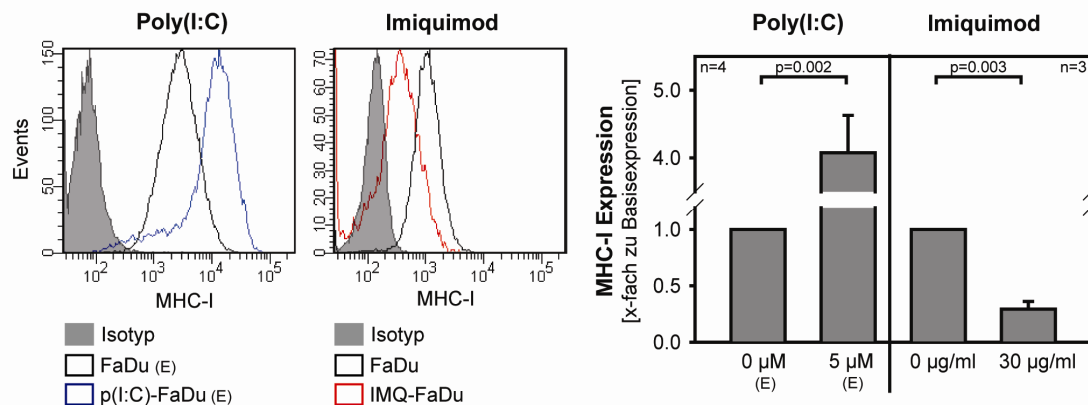
Poly(I:C) und Imiquimod induzieren demnach beide Zelltod, jedoch mit unterschiedlicher Beteiligung an Zytokin- und HMGB1-Ausschüttung. Wird sich diese Diskrepanz in einer späteren Immuninteraktion bemerkbar machen?



**Abb. 4.3: Poly(I:C) induziert Zytokinsekretion.** FaDu-Zellen wurden mit Poly(I:C) „p(I:C)“ transfiziert und mit Imiquimod „IMQ“ inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Überstände geerntet und auf ihren Gehalt an ausgeschütteten Faktoren hin untersucht. IL-6, CXCL-10 und HMGB1 wurde mittels ELISA quantifiziert. Typ I IFN wurden mittels HEK Blue I nachgewiesen. Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

#### 4.1.1.4 MHC-Klasse-I-Expression

Als letzter Charakterisierungsschritt sollte der Status immunaktivierender Moleküle auf der Oberfläche PRR-behandelter Tumorzellen genauer betrachtet werden. Essentielle antitumorale Effektorzellen des Immunsystems sind CTL und NK-Zellen. Beide Zelltypen interagieren direkt mit MHC-Klasse-I Molekülen auf der Tumorzelloberfläche. Eine hohe Moleküldichte erleichtert die Erkennung für CD8-Zellen. Kommt es hingegen zu einem Verlust oder einer Herunterregulation von MHC-I werden NK-Zellen gemäß der *Missing-self hypothesis* (s.a. Kapitel 1.3.1.1) aktiv. Aus diesem Grund wurde nach Behandlung mit den PRR-Liganden die Expressionsdichte an MHC-Klasse-I Molekülen auf FaDu-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.



**Abb. 4.4: Poly(I:C) und Imiquimod regulieren MHC-I-Expression gegenläufig.** FaDu-Zellen wurden mit den PRR-Liganden wie zuvor beschrieben stimuliert. Die Gesamtpopulation wurde geerntet und die Oberflächenexpression von MHC-I wurde mittels PE-gekoppeltem HLA-ABC-Antikörper durchflusszytometrisch quantifiziert. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment und der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test).

Erneut kam es zu einem konträren Ergebnis: Poly(I:C) bewirkte eine Hochregulation um das Vierfache, während Imiquimod eine Reduktion der MHC-I Moleküldichte auf ca 25% zur Folge hatte (Abb. 4.4). Welchen Einfluss hat dieser Unterschied auf das Immunsystem?

#### 4.1.2 Unterschiedliche Immunaktivierung von Poly(I:C)- und Imiquimod-behandelten Tumorzellen

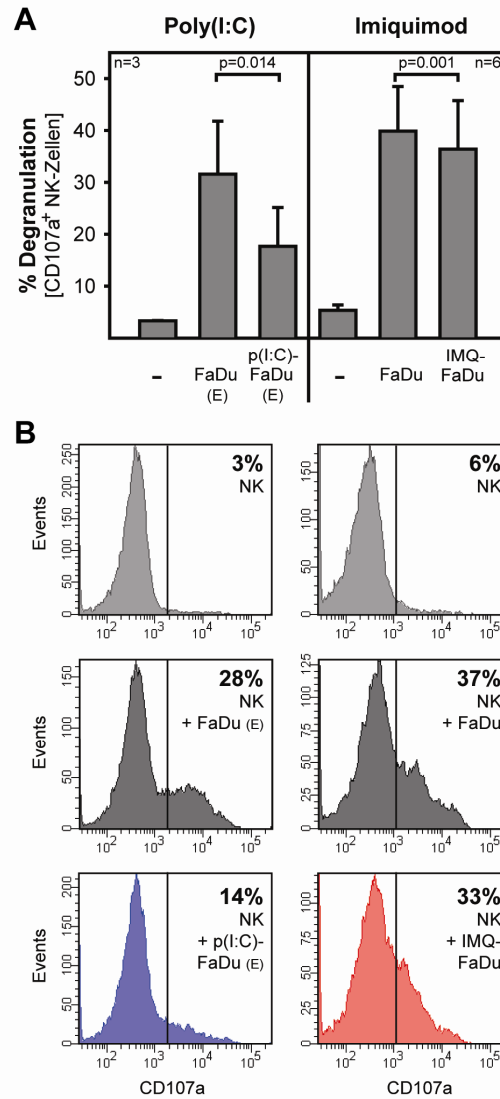
Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl Poly(I:C) als auch Imiquimod Zelltod in der KHT-Zelllinie FaDu induzieren können. Poly(I:C) führt zusätzlich zu einer umfassenden Zytokinausschüttung und Hochregulation von MHC-I. Imiquimod hingegen bewirkt ausschließlich eine starke Freisetzung von HMGB1 und eine Verringerung der MHC-I-

Expression. Im zweiten Abschnitt sollte nun untersucht werden, inwieweit diese Effekte Einfluss auf Immunzellen nehmen.

#### *4.1.2.1 Hemmung der NK-Zell-Degranulation*

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob die durch Imiquimod-verursachte Verringerung der MHC-I Moleküle eine Aktivierung von NK-Zellen verursachte. Hierfür wurden NK-Zellen mit PRR-behandelten sowie unbehandelten FaDu-Zellen für fünf Stunden kokultiviert und die NK-Degranulation über CD107a-Messung durchflusszytometrisch quantifiziert. Da nach beiden Behandlungen ca. 50% der im CASY Counter gezählten FaDu-Zellen Annexin-V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup> und somit viabel waren, wurde eine doppelt so hohe FaDu-Zellzahl mit NK-Zellen zusammen gegeben, sodass am Ende in allen Ansätzen das Verhältnis einer NK-Zelle zu einer lebenden FaDu-Zelle bestehen blieb. Wie zu erwarten war, führte die erhöhte MHC-I-Expression auf Poly(I:C)-behandelten FaDu-Zellen zu einer verringerten NK-Zell-Degranulation (Abb. 4.5 A und B). Überraschenderweise jedoch hatte auch die durch Imiquimod nach unten regulierte MHC-I-Dichte eine schwache Reduktion der NK-Zell-Degranulation zur Folge (Abb. 4 A und B). Abbildung 4.5 B zeigt ein repräsentatives Beispiel.

Somit konnte für keinen der beiden PRR-Liganden eine NK-Aktivierung nachgewiesen werden.



**Abb. 4.5: PRR-Behandlung hemmt NK-Degranulation.** (A) FaDu-Zellen wurden mit Poly(I:C) transfiziert und mit Imiquimod inkubiert. Die Gesamtpopulation lebender und toter FaDu-Zellen wurde geerntet und im Verhältnis eine lebende Tumorzelle zu einer NK-Zelle inkubiert. Monensin und CD107a-FITC-Antikörper wurden der Kultur beigelegt. Nach 5 Std. wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch analysiert. NK-Zellen wurden anhand des FSC/SSC von den Tumorzellen unterschieden. Ihre Degranulation wurde anhand CD107a<sup>+</sup> Zellen quantifiziert. Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SD. (B) Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test).

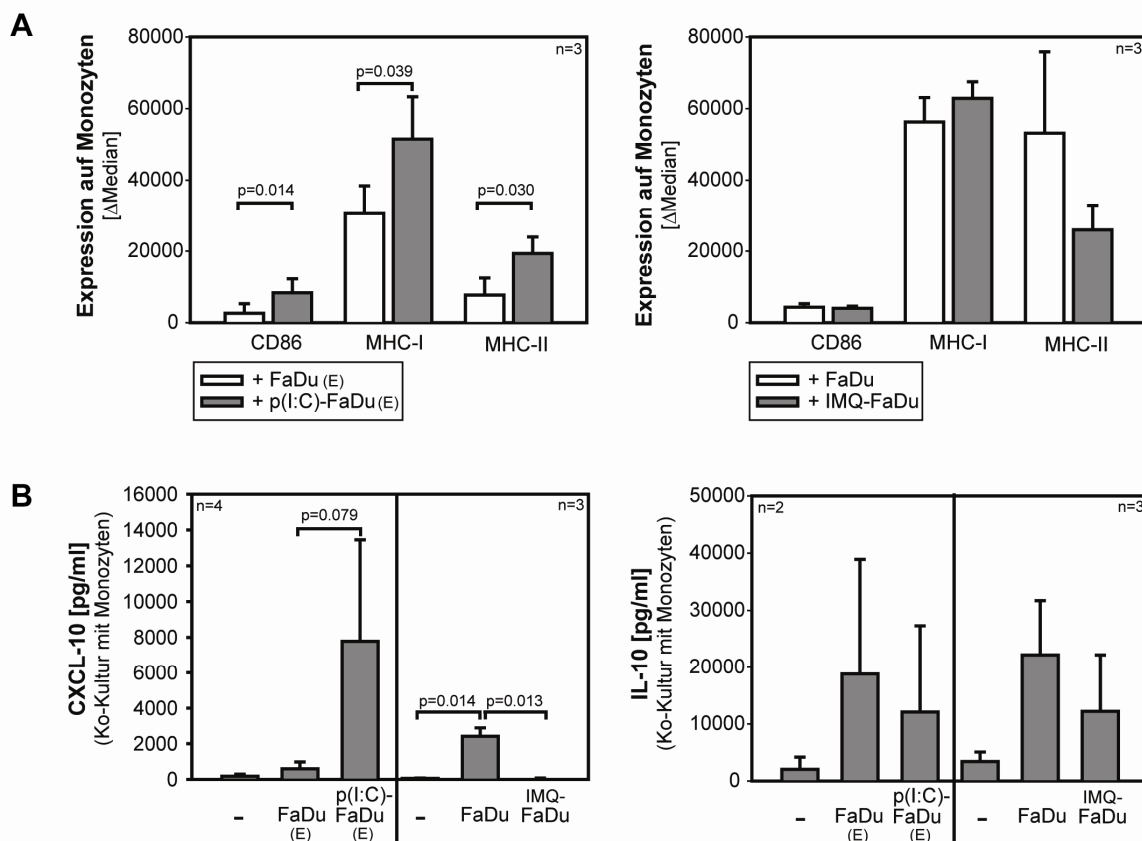
#### 4.1.2.2 Aktivierung von Monozyten durch Poly(I:C)-behandelte FaDu-Zellen

Zur Initiierung einer effektiven adaptiven Immunantwort müssen phagozytierende, antigen-präsentierende Zellen aktiv werden. In diesem Kapitel sollte daher der Effekt der durch PRR-Behandlung hervorgerufenen Tumorzellmodifikationen auf Monozyten untersucht werden. Die PRR-Liganden sollten in diesem Ansatz nicht mit Monozyten in Kontakt kommen, da hierbei der Focus auf der Interaktion der Immunzelle mit Zelltrümmern und Zytokinmix lag. Aus diesem Grund wurde das Stimulationsschema der FaDu-Zellen dahingehend angepasst,



dass nach erfolgter Vorinkubation (bei Poly(I:C) 7 Stunden, bei Imiquimod 48 Stunden) ein Mediumwechsel stattfand und die Tumorzellen für weitere 48 Stunden inkubiert wurden. Dies hatte einen Anteil von 50% lebender Zellen zur Folge. Anschließend wurden MACS-isolierte CD14<sup>+</sup> Monozyten im Verhältnis 2:1 zu den vorbehandelten Tumorzellen gegeben (2 Monozyten: 1 FaDu-Zelle). Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometer phänotypisch untersucht. Der Überstand wurde für Zytokinquantifizierungen herangezogen (s.a. Abb.3.1).

Es zeigte sich deutlich, dass Monozyten, die mit Poly(I:C)-behandelten FaDu-Zellen in Kontakt getreten waren, aktiviert wurden (Abb. 4.6 A). Sie hatten die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86, sowie die der antigenpräsentierenden MHC-I- und MHC-II-Moleküle gesteigert. Imiquimod-behandelte FaDu-Zellen hingegen konnten den Aktivierungsstatus von Monozyten nicht fördern (Abb. 4.6). Im Gegenteil, ihre Fähigkeit aufgenommene Antigene zu präsentieren könnte sogar leicht vermindert sein, da eine schwächere MHC-II-Expression beobachtet wurde.



**Abb. 4.6: Poly(I:C)-behandelte FaDu-Zellen aktivieren Monozyten.** (A) FaDu-Zellen wurden mit Poly(I:C) transfiziert bzw. mit Imiquimod inkubiert und gewaschen. Monozyten wurden im Verhältnis 2:1 zu den Tumorzellen gegeben und für weitere 48 Std kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (B) In den Überständen aus (A) wurde mittels ELISA die CXCL-10- und IL-10-Konzentrationen bestimmt. Die Werte sind um Konzentrationen im FaDu-Überstand ohne Monozyten korrigiert. Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test).

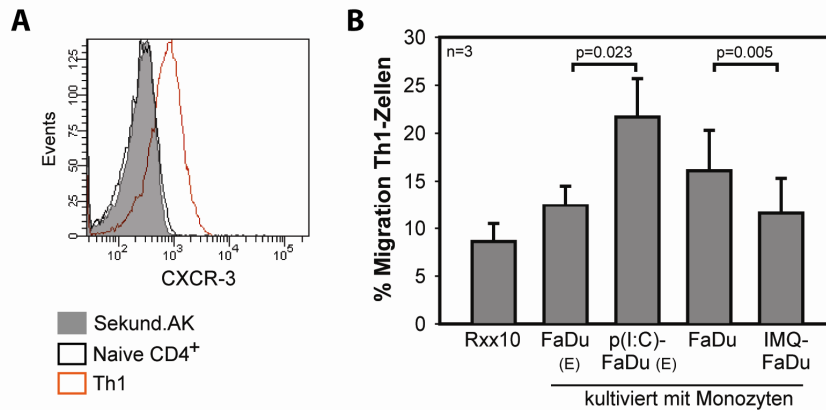
Eine weitere wichtige Funktion von Monozyten ist die Ausschüttung von Zytokinen. Im Überstand FaDu-stimulierter Monozyten konnte kein TNF $\alpha$  und IL-12 nachgewiesen werden, dafür aber CXCL-10 (Abb. 4.6 B). Dessen Konzentration war in allen Kokulturen mit Monozyten höher als im Überstand simultan kultivierter FaDu-Zellen alleine und wurde um den Wert der FaDu-Zellen korrigiert. Durch Kokultur von Monozyten mit Poly(I:C)-behandelten FaDu-Zellen kam es zu einer enormen Ausschüttung von CXCL-10. Hingegen war die CXCL-10-Menge im Überstand der Kokultur aus Imiquimod-behandelten FaDu-Zellen mit Monozyten geringer als wenn Monozyten mit konventionellen FaDu-Zellen inkubiert wurden (Abb. 4.6 B). Zusätzlich wurden die Überstände hinsichtlich IL-10 analysiert. Durch Kontakt mit den Tumorzellen schütteten Monozyten IL-10 aus (Abb. 4.6 B). In Kokultur mit PRR-behandelten FaDu-Zellen war die IL-10-Konzentration in beiden Gruppen leicht reduziert. Inkubation Poly(I:C)-behandelter Tumorzellen mit Monozyten führt also nicht *per se* zu einer gesteigerten Zytokinausschüttung. Es kann jedoch festgehalten werden, dass Imiquimod-Behandlung von Tumorzellen keine Aktivitätssteigerung in Monozyten hervorrufen kann. Hingegen steigern Poly(I:C)-behandelte FaDu-Zellen den Aktivierungsstatus von Monozyten und führen zu einer signifikanten CXCL-10 Ausschüttung. Welchen Einfluss hat CXCL-10 auf das umliegende Gewebe und die Zellen darin?

#### 4.1.2.3 Förderung der Th1-Migration durch Poly(I:C)-Behandlung

Da divergente CXCL-10-Konzentration in den Überständen der beiden Stimulationsansätze auftraten, sollte deren Bedeutung für das Tumormilieu eruiert werden. Zum einen wirkt CXCL-10 typischerweise als Chemoattraktans für Th1-Zellen. Um diesen Effekt zu überprüfen, wurde der Überstand von Monozyten, die mit PRR-behandelten FaDu-Zellen inkubiert worden waren, Th1-Zellen zur Migration zur Verfügung gestellt. Th1-Zellen zeichnen sich u.a. durch die Hochregulation des CXCL-10-Rezeptors CXCR-3 aus. Zunächst wurde hierfür ein Protokoll etabliert, das die *in vitro*-Generierung von Th1-Zellen aus naiven CD4<sup>+</sup> Zellen ermöglichte. Ihre CXCR-3-Expression wurde am Ende der 10-Tage-Polarisierung durchflusszytometrisch kontrolliert (Abb. 4.7 A).

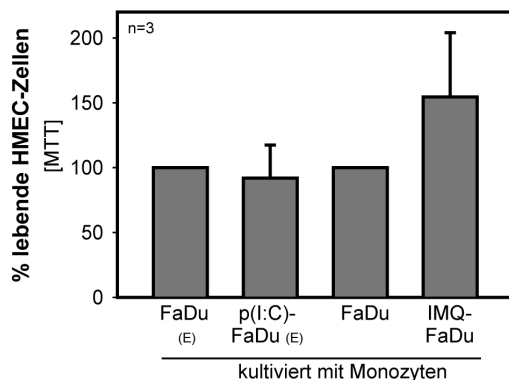
Zur Ermittlung der Spontanmigration wurde Rxx10 verwendet. Der Überstand der Monozyten/FaDu-Kokultur förderte die Migration von Th1-Zellen (Abb. 4.7). Wie zu erwarten, war der CXCL-10-reiche Überstand der Monozyten/Poly(I:C)-FaDu-Kokultur ein weitaus stärkeres Chemoattraktans als der Überstand von Monozyten, die mit unbehandelten FaDu-Zellen inkubiert worden waren (Abb. 4.7 B). Imiquimod-Behandlung der Tumorzellen

und Kokultur mit Monozyten führte zum gegensätzlichen Effekt: es wanderten weniger Th1-Zellen.



**Abb. 4.7: Poly(I:C) fördert indirekt die Migration von Th1-Zellen.** (A) CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels MACS-Technologie aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für 10 Tage in Gegenwart von IL-2, IL-12 und PHA in Richtung CXCR-3-exprimierender Th1-Zellen polarisiert. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment. (B) 24-well Platten mit 5µm-Transwell-Einsätzen wurden für die Chemotaxismessung verwendet. In die untere Kammer wurde der Überstand der 48 Std. Kokultur aus Monozyten und Poly(I:C)/Imiquimod-FaDu gegeben. Als Kontrolle diente Rxx10. 0.5x10<sup>6</sup> Th1-polarisierte Zellen wurden in die obere Kammer pipettiert und im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Std. wurden die nach unten gewanderten Zellen mit Hilfe des Casy Counters gezählt. Abgebildet ist der Mittelwert ± SD. Statistische Signifikanz wurde mit p<0.05 erreicht (Student's t-Test).

Ein weiteres Charakteristikum für CXCL-10 ist seine antiangiogenetische Eigenschaft. Um diese Wirkung zu überprüfen, wurde die Endothelzelllinie HMEC verwendet. Nach Adhäsion der Zellen wurde das Medium abgenommen und durch die unterschiedlich hergestellten Monozyten/FaDu-Überstände ersetzt. Nach 48 Stunden wurde die Zellzahl mittels MTT-Messung bestimmt. Überraschenderweise konnte der CXCL-10-reiche Überstand die Zellzahl der HMEC im Vergleich zum Überstand der Monozyten/FaDu-Kokultur nicht verringern (Abb. 4.8). Jedoch führte der Überstand aus Monozyten und Imiquimod-behandelten Tumorzellen zu einer erhöhten aber nicht signifikanten HMEC-Zellzahl.



**Abb.4.8: CXCL-10 reicher Überstand kann HMEC-Zellzahl nicht reduzieren.** 5x10<sup>3</sup> HMEC wurden, in Endothelmedium resuspendiert, in 96-well Platten eingesetzt. Am Folgetag wurde das Medium durch die unter Abb. 4.6 beschriebenen Überstände ersetzt. Zellzahl wurde nach 48 Std mittels MTT bestimmt. Abgebildet ist der Mittelwert ± SD.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Poly(I:C) und Imiquimod zwar in einem ähnlichen Ausmaß Tumorzelltod induzieren, es nachfolgend jedoch zu einer ungleichen Zytokinausschüttung und Monozytenaktivierung kommt.

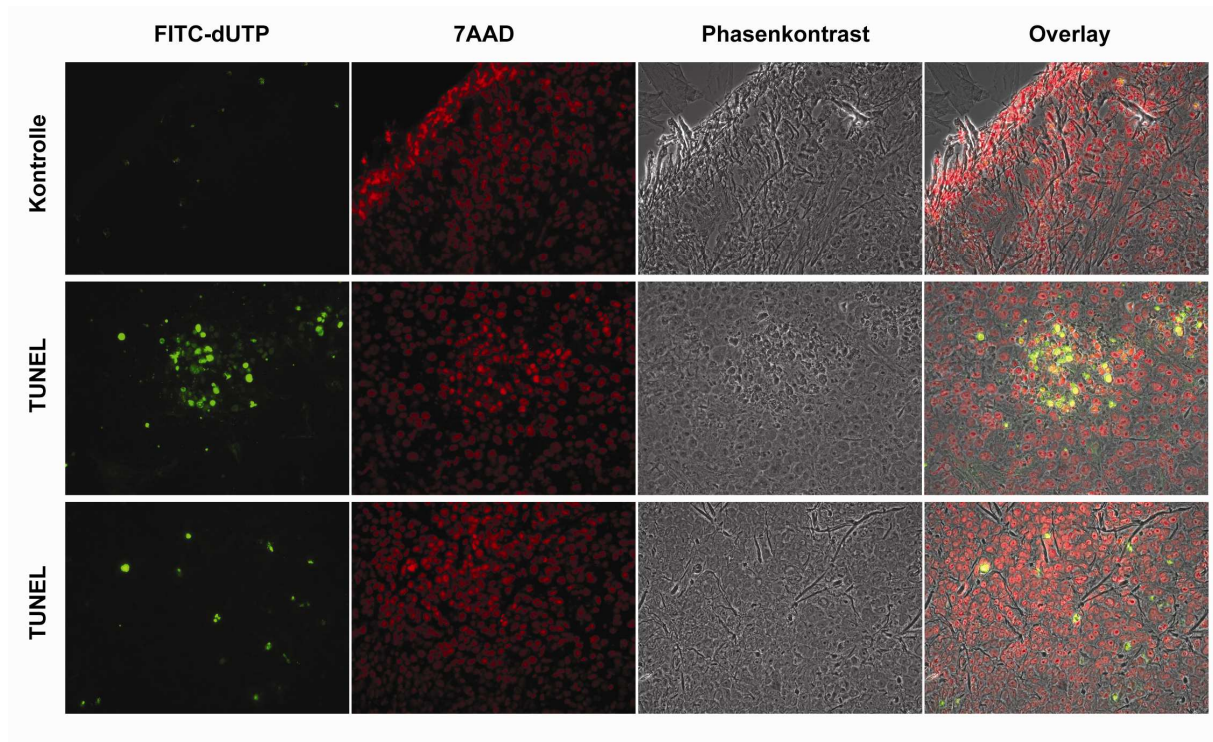
#### **4.1.3 In vivo Analyse der Poly(I:C)- und Imiquimod-Behandlung im Xenograft-Tumormausmodell**

Im letzten Kapitel der vorliegenden Arbeitshypothese sollten die *in vitro* gefundenen Unterschiede nach Poly(I:C)- und Imiquimod-Behandlung in einem Tumormodell überprüft werden. Als Modell hierfür wurden Nacktmäuse verwendet. Diese besitzen keinen Thymus und demzufolge auch weder T-Zellen noch eine effektive B-Zell-Immunität. In 4-6 Wochen alte, männliche Nacktmäuse wurden  $1 \times 10^6$  FaDu-Zellen subkutan dorsal injiziert. Nach drei bis vier Wochen, als die Tumorgroße 4x6 mm oder 5x5 mm erreicht hatte, wurden 50 µg Poly(I:C) oder 50 µg Imiquimod intratumoral appliziert. Nach einem, nach drei oder fünf Tagen post Injektion (p.i.) wurden die Mäuse euthanasiert, der Tumor explantiert und eingefroren wie im Kapitel 3.4 beschrieben. In jeder Gruppe gab es eine Kontrollmaus, die eine PBS-Injektion erhielt. Mit Hilfe von Gefrierschnitten der Tumoren konnten histologische Untersuchungen angeschlossen werden, um folgende Fragen zu beantworten: Kann *in vivo* Tumorzelltod induziert werden? Wie variiert die HMGB1-Expression? Können CXCL-10<sup>+</sup> Zellen detektiert werden? Unterscheidet sich die Vaskularisierung der Tumore? Finden sich Gegensätze in der MHC-I- Expression?

##### *4.1.3.1 Induktion von Zelltod in vivo durch Poly(I:C) und Imiquimod*

Zunächst wurden die FaDu-Tumore aus der Maus histologisch auf tote Zellen untersucht. Hierfür wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Die Kontrollfärbung ohne Enzym zeigte lediglich am Rand schwache Signale, weshalb dieser für die Auswertung nicht berücksichtigt wurde (Abb. 4.9 oben).

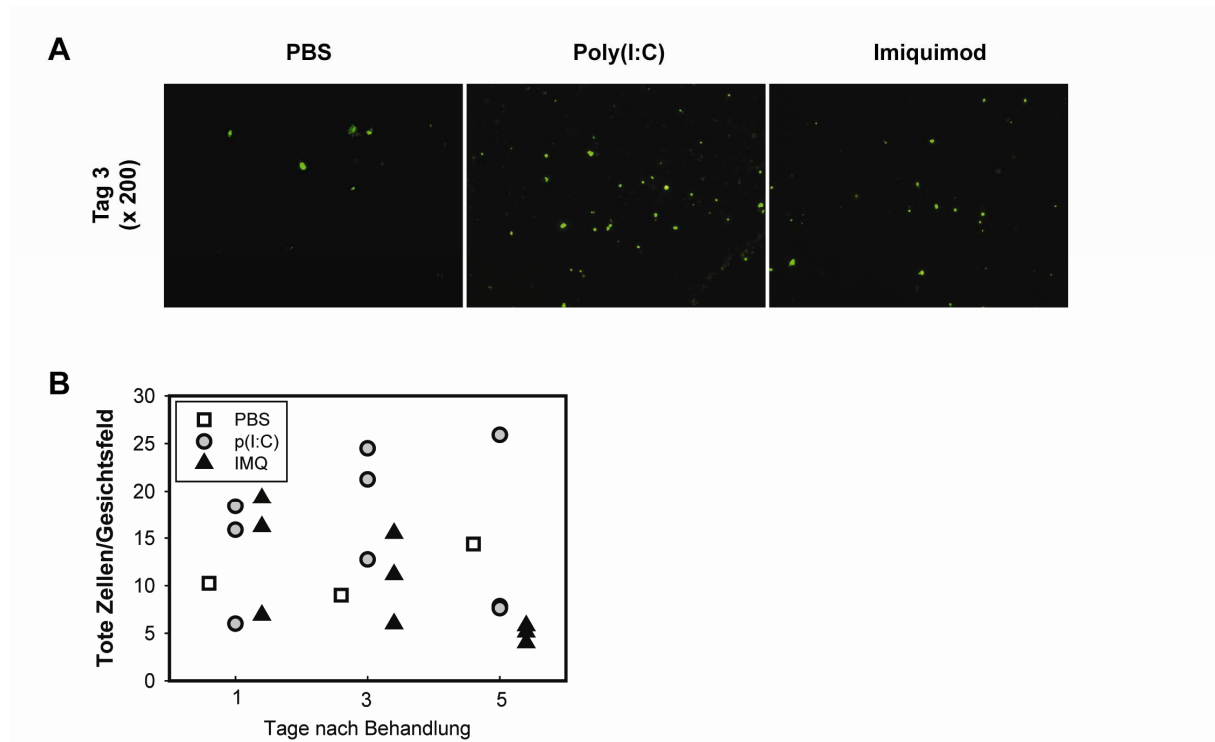
In acht Schnitten traten ein bis drei Häufungen stark positiver Zellen auf, die in einem Kreis oder einer Linie angeordnet waren (Abb. 4.9 mitte). Hierbei konnte kein Muster bezüglich Therapie oder Zeitpunkt festgestellt werden, weshalb diese Regionen nicht für die Auswertung herangezogen wurden. Im größten Teil der Schnitte waren deutlich vereinzelte, tote Zellen zu sehen (Abb. 4.9 unten).



**Abb. 4.9: Detektion toter Zellen in Maustumoren.** Detektion toter Zellen auf Maustumoren erfolgte mit Hilfe des BD ApoDirect Kits. FITC-markierte dUTPs visualisieren freie OH-Gruppen infolge von DNA-Brüchen. 7-AAD-Interkalierung färbt die Zellkerne rot. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen repräsentative Beispiele für 8 (mitte) bzw. 12 (unten) Maustumore. 200-fache Vergrößerung.

Abbildung 4.10 A zeigt ein repräsentatives Beispiel für die jeweilige Therapiegruppe an Tag drei p.i. An Tag eins und drei nach Injektion traten in der Poly(I:C)- und Imiquimod-Gruppe vermehrt TUNEL-positive Zellen auf (5/1x > PBS für Poly(I:C) und 4/2x > PBS für Imiquimod). Dies lässt auf die Induktion von Tumorzelltod durch das Therapeutikum schließen. An Tag fünf sinkt die Anzahl toter Zellen unterhalb das Level der Kontrolle.

Wie die Färbungen zeigen erhöhen Poly(I:C) und Imiquimod auch *in vivo* nach intratumoralen Applikation Tumorzelltod.



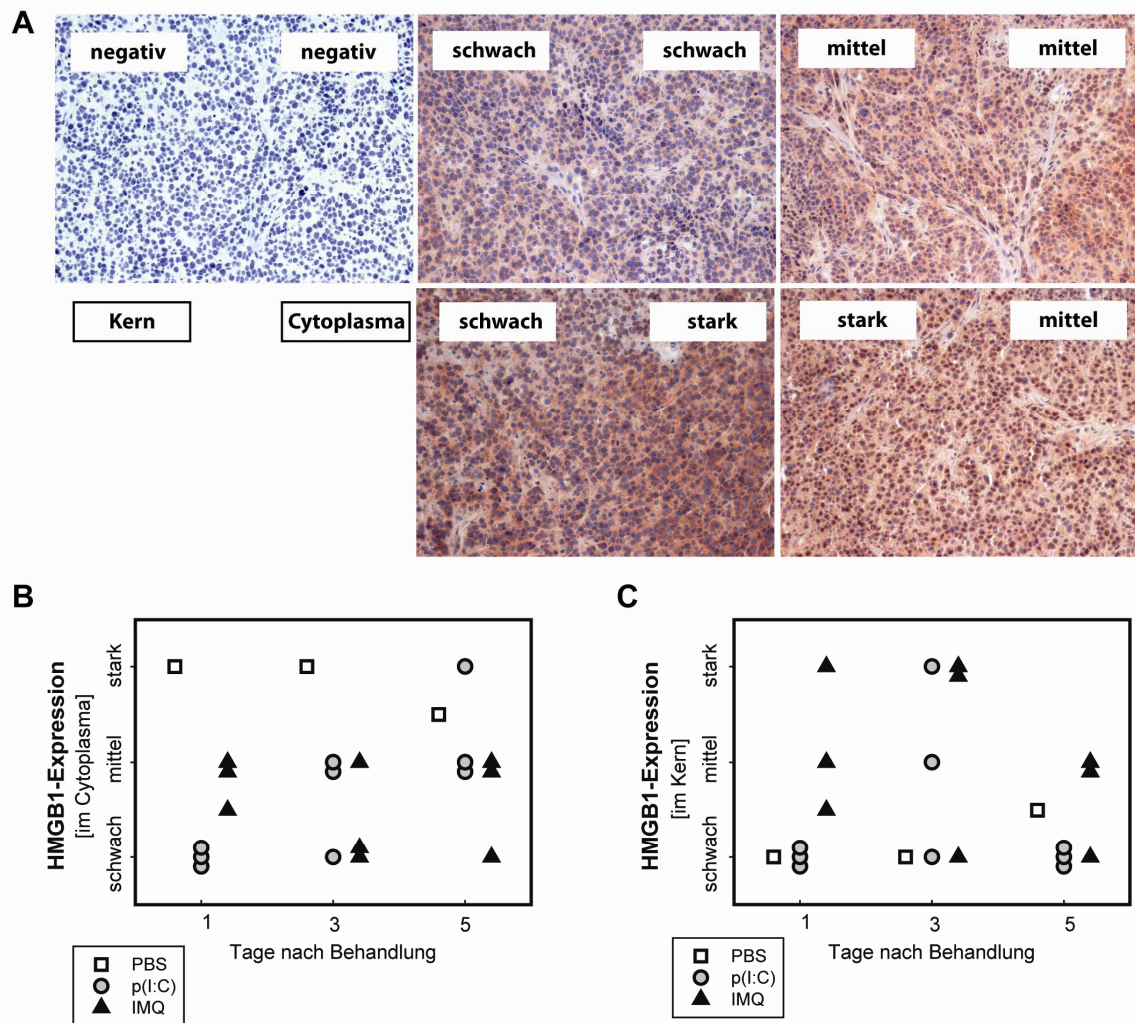
**Abb. 4.10: Poly(I:C) und Imiquimod erhöhen Tumorzelltod *in vivo*.**  $1 \times 10^6$  FaDu-Zellen wurden Nacktmäusen subkutan dorsal injiziert. Ab einer Größe von 4x6 mm bzw. 5x5 mm wurde Poly(I:C), Imiquimod oder PBS intratumoral injiziert. Mäuse wurden an Tag 1, 3 oder 5 p.i. euthanasiert, der Tumor explantiert und eingefroren. 5 mm dicke Gefrierschnitte wurden mit Hilfe des BD ApoDirect Kits gefärbt und bezüglich ihrer Anzahl toter Zellen analysiert. 200-fache Vergrößerung.

#### 4.1.3.2 Nukleäre HMGB1-Lokalisation *in vivo* durch Imiquimod

In vitro konnte eine erhöhte HMGB1-Ausschüttung nach PRR-Stimulation beobachtet werden. Hierbei war der Effekt durch Imiquimod dem durch Poly(I:C) überlegen. Daher wurden die FaDu-Tumorschnitte histologische auf HMGB1-Expression hin untersucht. HMGB1 lag sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma der Tumore vor (Abb. 4.11 A). Daher wurden diese beiden Parameter getrennt voneinander anhand einer Expressions-Skala evaluiert, wie in Abb 4.11 dargestellt ist.

Tatsächlich führt die Behandlung mit Poly(I:C) ( $8/1x < \text{PBS}$ ) und Imiquimod ( $9/0x < \text{PBS}$ ) zu einer reduzierten HMGB1-Expression im Cytoplasma verglichen mit der Kontrolle (Abb. 4.11 B). Dies lässt auf eine Ausschüttung von HMGB1 schließen. Überraschenderweise jedoch ist gleichzeitig die HMGB1-Expression im Zellkern vor allem durch Imiquimod-Behandlung ( $7/2x > \text{PBS}$ ) erhöht (Abb. 4.11 C). Somit kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob HMGB1 aus dem Cytoplasma in den Kern transloziert wurde, oder ob eine Ausschüttung plus gleichzeitiger Proteinneusynthese stattgefunden hat.

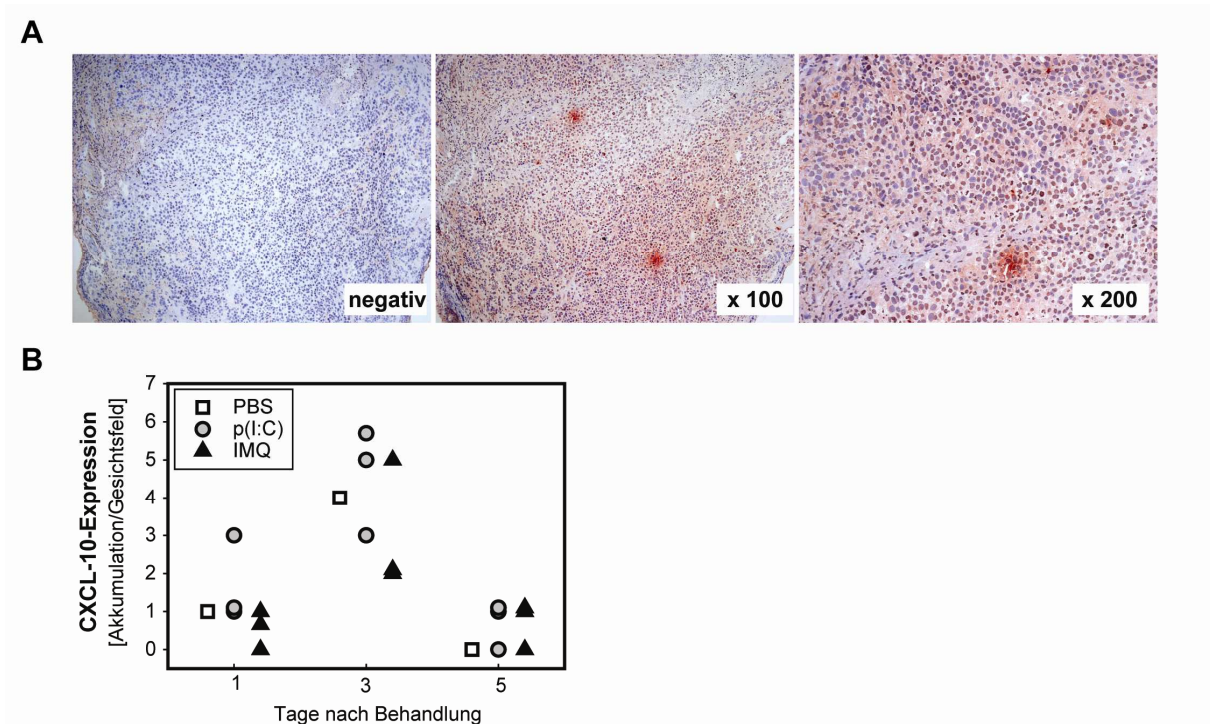




**Abb. 4.11: Imiquimod beeinflusst subzelluläre HMGB1-Lokalisation *in vivo*.** (A) Gefrierschnitte der FaDu-Tumoren wurden zur Analyse der HMGB1-Expression kolorimetrisch gefärbt. Aufgrund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation wurden zwei Skalen verwendet, die die Expressionsstärke im Cytoplasma (B) und im Kern (C) getrennt voneinander einstufen. Die negative Kontrollfärbung mit dem Sekundärantikörper alleine zeigt die Spezifität der Färbung. 200-fache Vergrößerung.

#### 4.1.3.3 Unveränderte CXCL-10-Expression im Tumor

Poly(I:C)-Behandlung der Tumorzellen führte *in vitro* zu einer Freisetzung von CXCL-10. Es stellte sich die Frage, ob auch *in vivo* Tumorzellen auf Poly(I:C)-Behandlung hin mit Zytokinausschüttung reagieren. Bei der histologischen Färbung von CXCL-10 auf FaDu-Schnitten konnten Bereiche mit stark positiven Zellen detektiert werden (Abb. 4.12 A). Die Färbung im restlichen Bereich der Tumore unterschied sich kaum zwischen den Gruppen. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Akkumulationen von CXCL-10<sup>+</sup> Zellen zur Auswertung herangezogen.



**Abb. 4.12: PRR-Injektion reguliert kaum CXCL-10-Expression.** Gefrierschnitte der FaDu-Tumoren wurden zur Analyse der CXCL-10-Expression kolorimetrisch gefärbt. (A) zeigt ein repräsentatives Beispiel des Expressionsniveaus. (B) Zur quantitativen Auswertung wurde die Anzahl der stark CXCL-10+ Bereiche verwendet. Die negative Kontrollfärbung mit dem Sekundärantikörper alleine zeigt die Spezifität der Färbung.

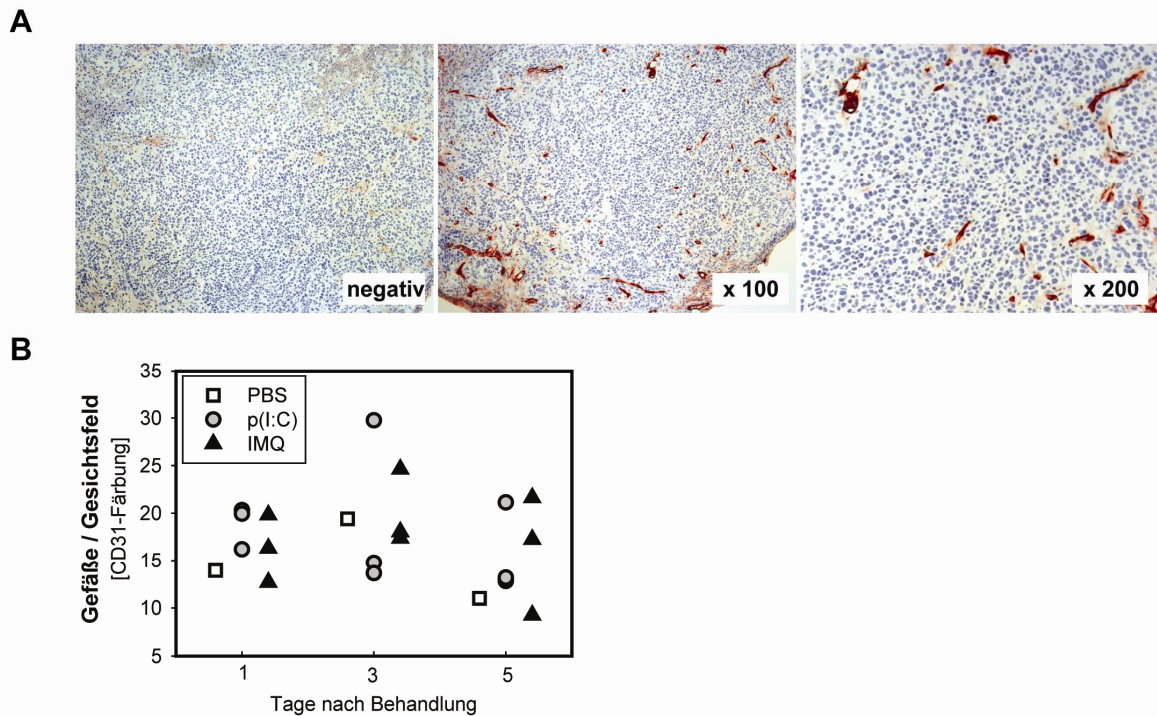
Die Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle sind hierbei sehr gering (Abb. 4.12 B). Es können keine eindeutigen Effekte von Poly(I:C) (5/4x > PBS) und Imiquimod auf die CXCL-10-Expression *in vivo* beobachtet werden.

#### 4.1.3.4 Unveränderte Vaskularisierung in Tumoren

Lösliche Faktoren von Monozyten und Poly(I:C)- bzw. Imiquimod-behandelten FaDu-Zellen hatten die Proliferation von HMECs nicht eindeutig beeinflussen können. Mit Hilfe einer CD31-Färbung sollte *in vivo* die Vaskularisierung der Tumore untersucht werden. Hierfür wurde die Anzahl CD31<sup>+</sup> Gefäße, unabhängig ihrer Größe, für die Auswertung heran gezogen (Abb. 4.13 A).

Es gilt zu beachten, dass die beiden PRR-Liganden bei intratumoraler Injektion direkte Wirkung auf Endothelzellen ausüben können. An Tag eins und fünf p.i. scheinen die beiden PRR-Liganden die Vaskularisierung begünstigt zu haben. Jedoch liegen die Werte nahe beieinander und schwanken zu sehr in beide Richtungen der PBS-Kontrolle (siehe Tag drei). Es kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob einmalige Injektion von Poly(I:C) oder Imiquimod die Vaskularisierung der Tumore beeinflusst.



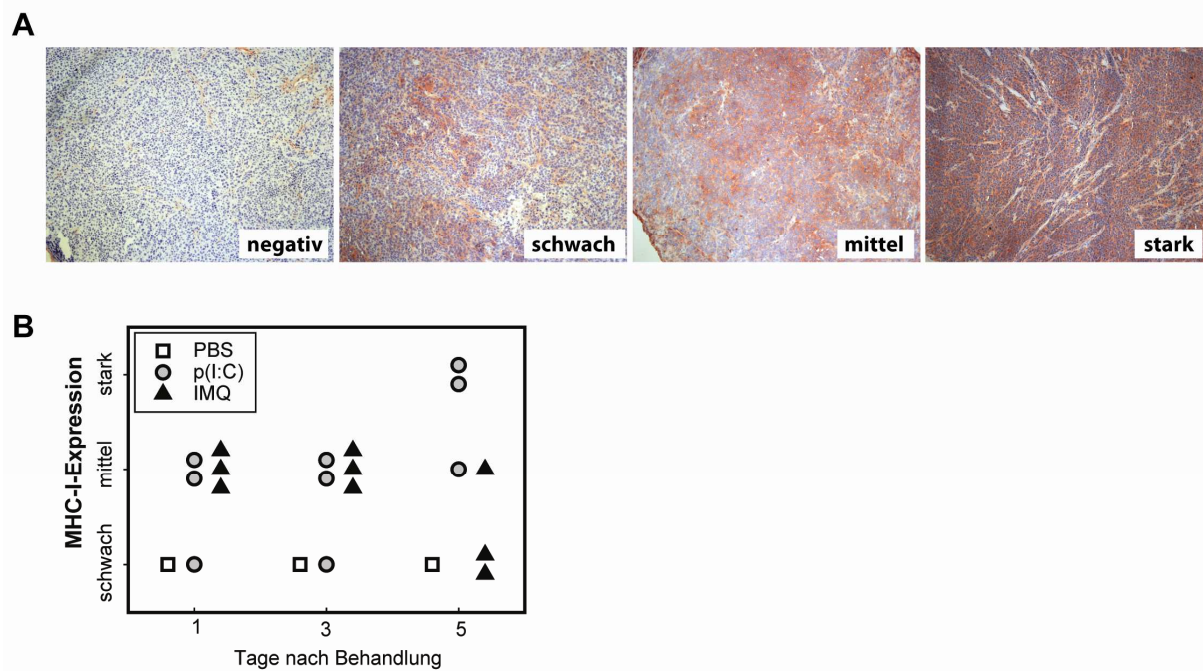


**Abb. 4.13: PRR-Injektion reguliert kaum Vaskularisierung.** (A) Kolorimetrische Detektion CD31+ Zellen diente der Analyse der Vaskularisierung in Gefrierschnitten der FaDu-Tumoren. (B) Zur quantitativen Auswertung wurde die Anzahl der CD31<sup>+</sup> Gefäße/ Gesichtsfeld verwendet. Die negative Kontrollfärbung mit dem Sekundärantikörper alleine zeigt die Spezifität der Färbung.

#### 4.1.3.5 Regulation der MHC-I-Expression durch Poly(I:C)- und Imiquimod *in vivo*

*In vitro* hatte Poly(I:C) eine Hochregulung, Imiquimod hingegen eine Runterregulung der MHC-I-Expression auf Tumorzellen induziert. Die tumorale Dichte von MHC-I-Molekülen *in vivo* wurde mittels einer Expressions-Skala evaluiert (Abb. 4.14 A).

An Tag eins und Tag drei p.i. hatte in beiden Fällen die Therapie mit PRR-Liganden eine Expressionsverstärkung von MHC-I zur Folge (Abb. 4.14 B). Diese reduzierte sich in der Imiquimod-Gruppe an Tag fünf. Im Gegensatz dazu steigerte sich *in vivo* die MHC-I-Expression nach Poly(I:C)-Behandlung an Tag fünf noch weiter. Am letzten Messtag ist also der deutlichste Unterschied zwischen den beiden Behandlungen zu beobachten und spiegelt die *in vitro* Funde wieder: Poly(I:C)-Behandlung führt zu einer höheren MHC-I-Expression auf Tumorzellen als Imiquimod-Behandlung.



**Abb. 4.14: Poly(I:C) und Imiquimod regulieren MHC-I-Expression *in vivo*.** Gefrierschnitte der FaDu-Tumoren wurden zur Analyse der MHC-I-Expression kolorimetrisch gefärbt. Eine Skala (A) wurde für die quantitative Auswertung (B) verwendet. Die negative Kontrollfärbung mit dem Sekundärantikörper alleine zeigt die Spezifität der Färbung. 100-fache Vergrößerung.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Poly(I:C)-behandelte Tumorzellen zu einer Immunaktivierung führten, was in der Aktivierung von Monozyten und nachfolgender Th1-Rekrutierung resultierte. Imiquimod-behandelte Tumorzellen hingegen konnten keine Monozytenaktivierung hervorrufen und führten nachfolgend sogar zu einer verminderten Th1-Rekrutierung. Auch die durch Imiquimod hervorgerufene reduzierte MHC-I-Expression konnte keine NK-Degranulation hervorrufen. Imiquimod führte somit zu einer Art nicht-immunogenem Zelltod. Einzig HMGB1 konnte auch im Überstand Imiquimod-behandelter Tumorzellen nachgewiesen werden.

Beide therapeutischen PRR-Liganden führten demnach zu Tumorzelltod und gleichzeitiger HMGB1-Freisetzung. Im nächsten Teil der Arbeit sollte detailliert untersucht werden, welchen Einfluss dieses Gefahrenmolekül auf T-Zellen besitzt.

## 4.2 Einfluss des endogenen PRR-Liganden HMGB1 auf regulatorische T-Zellen

HMGB1 kann prinzipiell auf zwei verschiedene Arten von Tumorzellen freigesetzt werden: 1. Aktiv als Antwort auf einen Stimulus hin. 2. Passiv beim Zellsterben (s.a. Kapitel 1.2 und 1.4.5). In einem progressiv wachsenden Tumor findet ein erhöhter *Zell-turn-over* statt, der absterbende und tote Zellen zur Folge hat. Man kann also von einer kontinuierlichen Freisetzung und dem Vorhandensein von HMGB1 im Tumormikromilieu ausgehen.

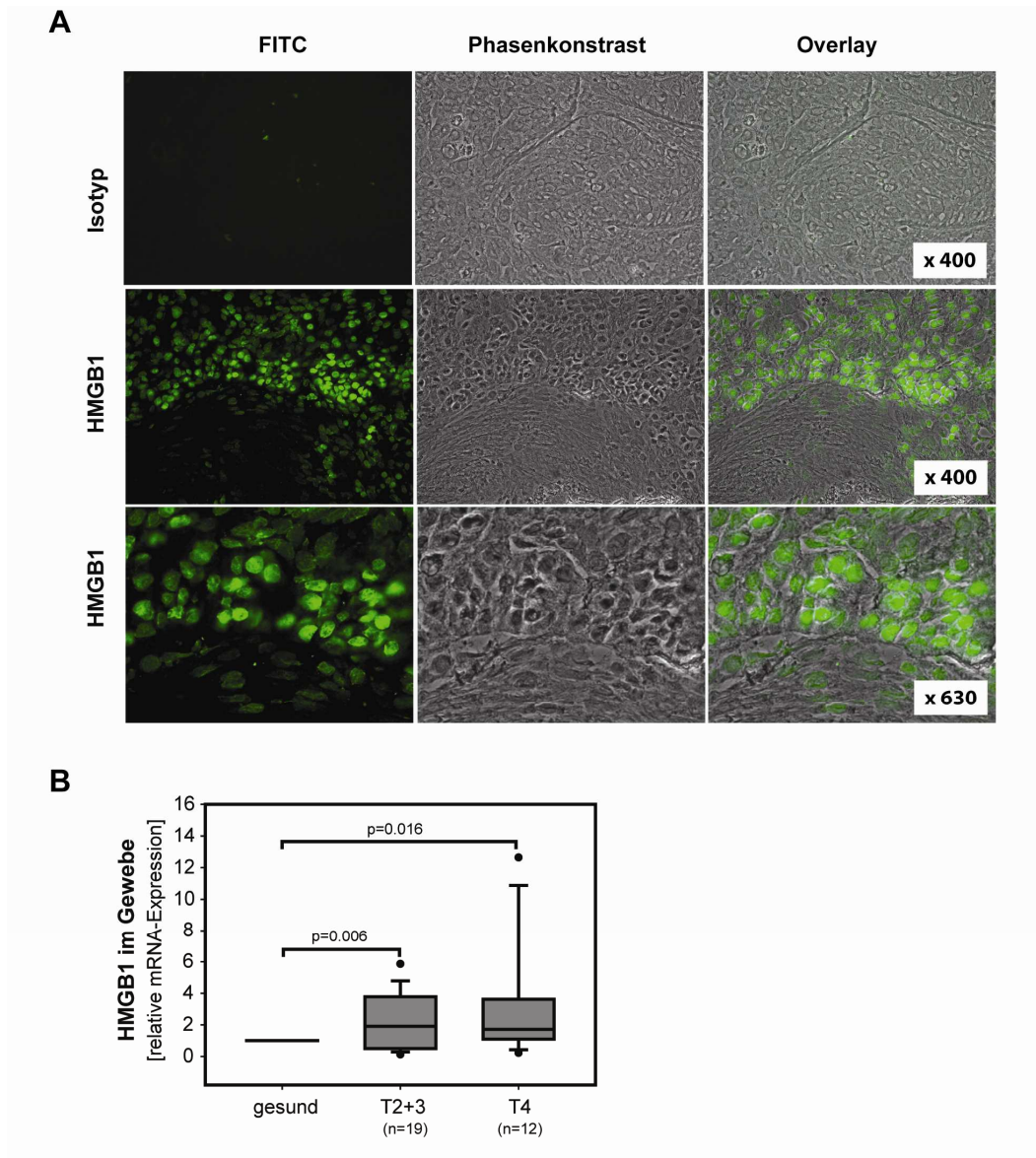
Da der Effekt von HMGB1 auf myeloide Zellen bereits ausführlich untersucht wurde (s.a. Kapitel 1.4.5), sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der Effekt von HMGB1 auf regulatorische und Effektor-T-Zellen untersucht werden, um folgende Fragen zu beantworten: Trägt HMGB1 T-Zell-vermittelt zum Tumor-Immun-*Escape* bei? Unterscheidet sich seine Wirkung bei gesunden Spendern und KHT-Patienten?

### 4.2.1 HMGB1-Expression in Kopf-/Halstumoren

#### 4.2.1.1 Erhöhte HMGB1-Expression im KHT-Gewebe

Zunächst sollte das Expressionsmuster von HMGB1 in Kopf-/Halstumoren charakterisiert werden. Hierfür wurden histologische Gefrierschnitte von Kopf-/Halstumoren (KHT) fluoreszenzmikroskopisch auf HMGB1-Expression hin untersucht. Es zeigte sich, dass HMGB1 verglichen zum Stroma vermehrt in den Tumorinseln vorhanden war (Abb. 4.15 A). Innerhalb einer Tumorinsel variierte die HMGB1-Konzentration stark. Es gab Bereiche mit mehr und weniger HMGB1. Aber auch zwischen benachbarten Zellen konnten große Unterschiede bestehen.

Zur Bestätigung dieses visuellen Ergebnisses und für eine bessere Quantifizierung wurde RNA aus KHT-Gewebe isoliert und nach erfolgter reverser Transkription semiquantitativ mittels RT-PCR auf HMGB1-Expression hin analysiert. Als Referenz wurde cDNA aus einem Pool von drei gesunden Schleimhautproben verwendet. Die HMGB1-Konzentration im Gewebe von T2/T3- sowie T4-Tumoren war signifikant erhöht (Abb. 4.15 B). Jedoch korrelierte die HMGB1-Menge nicht mit Parametern der TNM-Klassifizierung. Detaillierte Daten der Patienten, die in die Untersuchung eingeschlossen wurden finden sich in Tabelle 2.4.

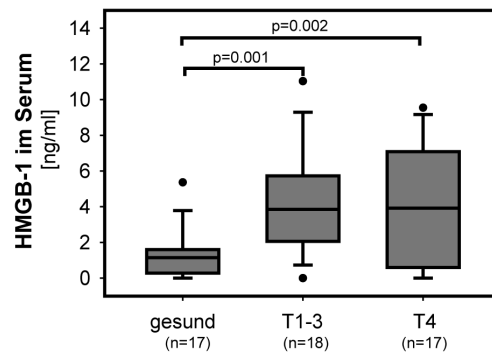


**Abb. 4.15: HMGB1-Expression ist im KHT-Gewebe erhöht.** (A) Gefrierschnitte von humanen KHT-Gewebe wurden für eine fluoreszenzmikroskopische Analyse mittels HMGB1-Antikörper und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper gefärbt. Die Abbildung zeigt 1 repräsentatives Beispiel von 7 untersuchten Geweben. (B) Relative HMGB1 mRNA-Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR und  $\beta$ -Actin als housekeeping-Gen analysiert ((2(-Delta Delta C(T)) Methode). Ein Pool aus drei Schleimhauteproben gesunder Spender wurde auf 1 gesetzt. Dazu wurden 32 Proben von KHT-Patienten verglichen. Boxplots zeigen Median, Interquartilsrange (25%, 75%) sowie Maximalwerte. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012b.

#### 4.2.1.2 Erhöhte HMGB1-Expression im Serum von KHT-Patienten

Wenn vermehrt HMGB1 im Tumorgewebe vorhanden ist, wird dieses dann auch verstärkt ins Blut abgegeben? Zur Beantwortung dieser Frage wurden Serumproben von gesunden Spendern und KHT-Patienten mittels ELISA auf ihre HMGB1-Konzentration hin analysiert. Verglichen mit gesunden Spendern, konnten signifikant erhöhte Mengen an HMGB1 im

Serum von KHT-Patienten nachgewiesen werden (Abb. 4.16). Erneut konnte keine Korrelation mit TNM-Klassifizierung festgestellt werden.

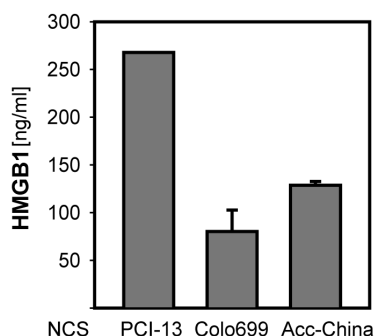


**Abb. 4.16: HMGB1-Konzentration ist im Serum von KHT-Patienten erhöht.** HMGB1-Serumkonzentration von 35 KHT-Patienten und 17 gesunden Spendern wurde mittels ELISA analysiert. Boxplots zeigen Median, Interquartilsbreite (25%, 75%) sowie Maximalwerte. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Mann-Whitney Rank Sum Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012b.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass bei KHT-Patienten erhöhte Mengen an HMGB1 im malignen Gewebe, sowie im Blut vorhanden sind. In beiden Kompartimenten kann es potentiell einen Einfluss auf Immunzellen nehmen.

#### 4.2.1.3 HMGB1-Expression in nekrotischem Zellüberstand von Tumorzelllinien

Im folgenden Teil der Arbeit sollte der Effekt von HMGB1 auf Tregs und Teffs untersucht werden. Neben rekombinantem HMGB1 soll auch eine natürliche HMGB1-Quelle zum Einsatz kommen. Üblicherweise wird dazu nekrotischer Zellüberstand (NCS; *necrotic cell supernatant*) durch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen hergestellt (Rovere-Querini *et al.* 2004). Bei diesem Prozess werden alle Moleküle, die normalerweise im Cytoplasma und Zellkern lokalisiert sind in den Überstand abgegeben; ähnlich wie beim nekrotischen Zelltod. Drei verschiedene Zelllinien wurden auf diese Weise prozessiert: die KHT-Zelllinien PCI-13 und Acc-China, sowie die Lungenadenokarzinom-Zelllinie Colo699. Zellen, die nachfolgend mit NCS stimuliert wurden traten demnach definitiv mit natürlichem HMGB1 in Kontakt (Abb. 4.17).

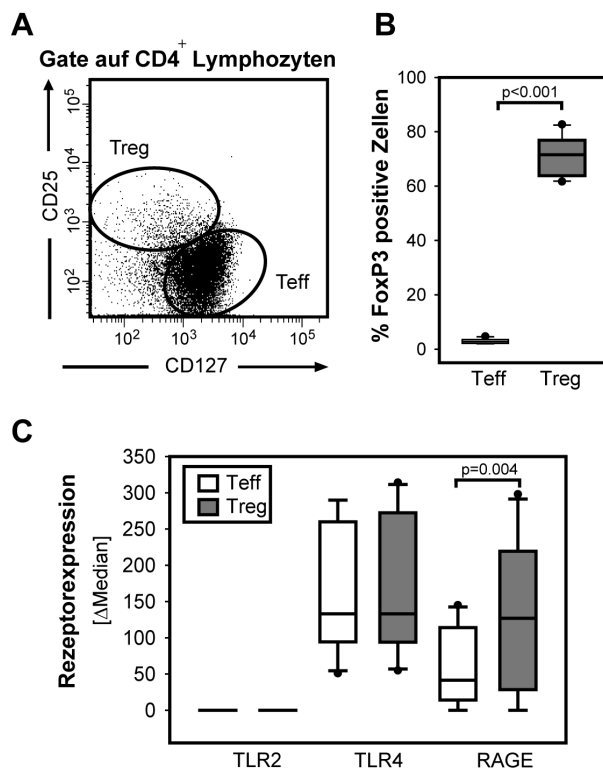


**Abb. 4.17: HMGB1 ist im NCS von Tumorzellen vorhanden.** Die Zelllinien PCI-13, Colo699 und Acc-China wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in RPMI resuspendiert. Zellintegrität wurde durch drei Einfrier- und Auftauzyklen zerstört. HMGB1-Konzentration im nekrotischen Überstand (NCS) wurde mittels ELISA gemessen.

## 4.2.2 Expression HMGB1-erkennender Rezeptoren auf T-Zellsubtypen

### 4.2.2.1 TLR4 und RAGE auf Tregs und Teffs von gesunden Spendern im Blut

HMGB1 kann von verschiedenen Musterkennungsrezeptoren gebunden werden. Hierzu gehören die Toll-like Rezeptoren 2 und 4, sowie der Multiliganden-Rezeptor RAGE. Bevor mit der funktionellen Analyse von HMGB1 auf Tregs und Teffs begonnen werden konnte, musste zunächst der Rezeptorstatus auf beiden T-Zellsubtypen analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden PBMCs aus dem Blut gesunder Spender durchflusszytometrisch analysiert. Die Oberflächenmarker CD4, CD25 und CD127 dienten dazu, Tregs und Teffs voneinander zu unterscheiden. Tregs zeichnen sich durch das Expressionsmuster  $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$  aus, während Teffs  $CD4^+CD25^-CD127^+$  sind. Zur besseren Veranschaulichung zeigt Abbildung 4.18. A diese *Gating*-Strategie. Die hohe Expressionsrate des Transkriptionsmarkers FoxP3 innerhalb der Treg-Population validiert die *Gating*-Strategie (Abb. 4.18 B).



**Abb. 4.18: Tregs und Teffs exprimieren TLR4 und RAGE. Analyse von Tregs und Teffs in PBMCs gesunder Spender.**

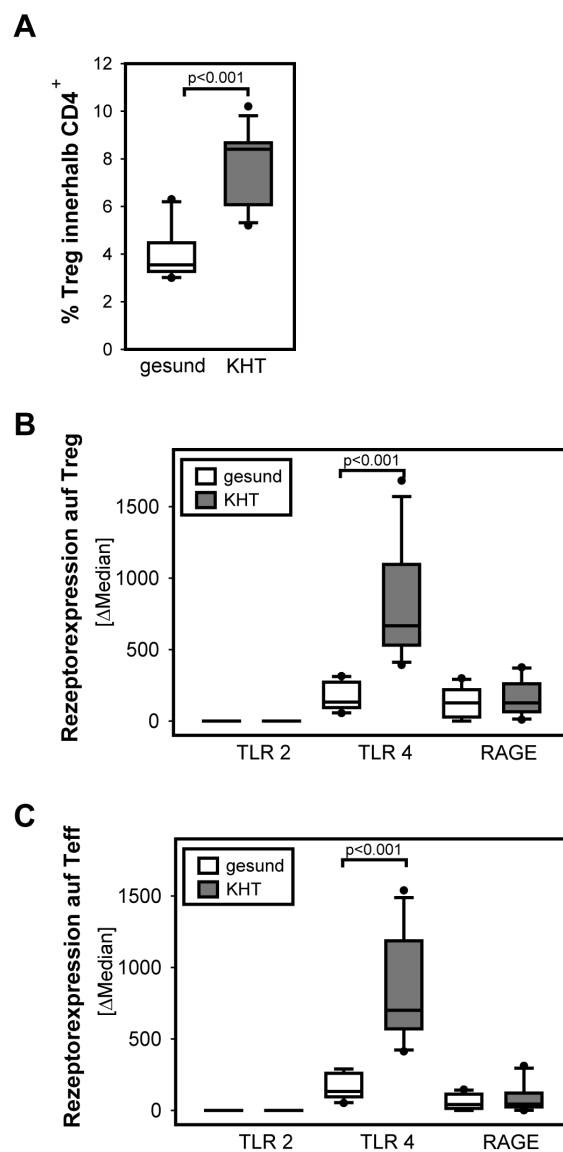
(A) *Gating*-Strategie zur Unterscheidung zwischen Tregs und Teffs. Tregs werden als  $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$  identifiziert, Teffs als  $CD4^+CD25^-CD127^+$ . (B) FoxP3-Expression wurde mittels intrazellulärer Färbung nach Fixierung und Permeabilisierung unter Verwendung des BD FoxP3 Staining Kits gemessen. (n=10). (C) Rezeptorexpression wurde anhand des  $\Delta$ Median quantifiziert. Dieser stellt die Differenz der Signalstärke aus spezifischem Antikörper und Isotypkontrolle (TLR4) bzw. Sekundärantikörper (RAGE) dar (n=10). Boxplots zeigen Median, Interquartilsbreite (25%, 75%) sowie Maximalwerte. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Mann-Whitney Rank Sum Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2010.

Tregs und Teffs zeigten eine ähnliche Expressionsstärke von TLR4, während auf Tregs eine höhere Dichte an RAGE nachgewiesen wurde (Abb. 18 C). Beide Populationen waren negativ für TLR2. Tregs und Teffs gesunder Spender besitzen folglich das Potential, HMGB1 zu binden. Werden die beiden Populationen ähnlich reagieren, da TLR4 ähnlich stark exprimiert

wird? Wird sich der Unterschied der RAGE-Expression funktionell niederschlagen? Diese Fragen sollen in späteren *in vitro*-Analysen beantwortet werden.

#### 4.2.2.2 Erhöhte TLR4-Expression auf Tregs und Teffs von KHT-Patienten

Da ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit der Vergleich mit KHT-Patienten darstellte, wurde im nächsten Schritt die Expressionsprofile von Tregs und Teffs denjenigen von KHT-Patienten gegenübergestellt. Wie bereits gezeigt, ist der Anteil an Tregs im Blut von KHT-Patienten doppelt so hoch wie bei gesunden Spendern (Abb. 19 A). Erneut konnte kein TLR2 nachgewiesen werden (Abb. 19 B und C).



**Abb. 4.19: TLR4-Expression ist auf Tregs und Teffs von KHT-Patienten erhöht.** Gating Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse von Tregs und Teffs in PBMCs von KHT-Patienten erfolgte wie in 4.17 A gezeigt. (A) Prozentualer Anteil von Tregs innerhalb CD4<sup>+</sup> Zellen von gesunden Spendern und KHT-Patienten (n=10). (B) Rezeptorexpression auf Tregs (B) und Teffs (C) von gesunden Spendern und



KHT-Patienten (n=10). Boxplots zeigen Median, Interquartilsbreite (25%, 75%) sowie Maximalwerte. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Mann-Whitney Rank Sum Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012a und 2012a.

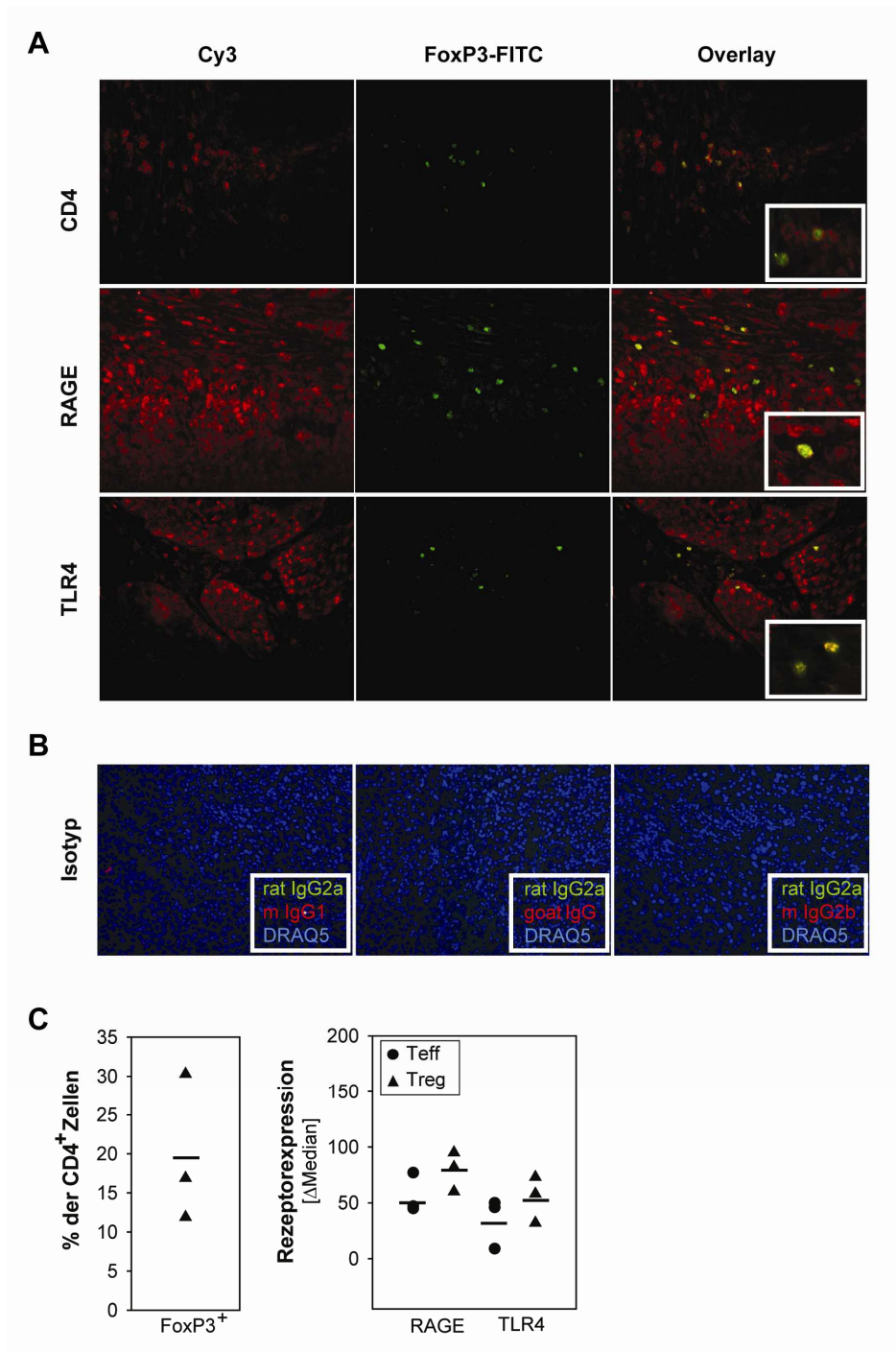
Die Expressionsstärke von RAGE war auf beiden Zellpopulationen zwischen gesunden Spendern und KHT-Patienten ähnlich. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch bei der TLR4-Expression. Diese war sowohl auf Tregs als auch auf Teffs bei KHT-Patienten deutlich höher als bei gesunden Spendern. Wird diese unterschiedliche TLR4-Expression auf einen Effekt von HMGB1 Einfluss nehmen? Es steht fest, dass im Blut zirkulierende Tregs und Teffs mit den notwendigen Rezeptoren ausgestattet sind, um auf HMGB1 zu reagieren.

#### 4.2.2.3 *TLR4 und RAGE auf Treg und Teff im Tumorgewebe*

Da erhöhte HMGB1-Konzentrationen nicht nur im Serum, sondern auch im Tumorgewebe selbst nachgewiesen wurden, sollte in einem letzten Schritt der Phänotypisierung untersucht werden, ob auch tumorinfiltrierende Tregs und Teffs das nötige Rezeptorequipment tragen, um HMGB1 zu erkennen. Hierfür wurden histologische Gefrierschnitte für den T-Zellmarker CD4 und den Treg-Marker FoxP3 simultan gefärbt.

Es zeigte sich, dass alle FoxP3-positiven Zellen im Stroma auch CD4 trugen (Abb. 20 A, oben). Somit konnte FoxP3 als alleiniger Treg-Marker verwendet werden. Als nächstes wurde FoxP3 mit TLR4 bzw. RAGE ko-gefärbt. Es konnten eindeutig doppelt positive Zellen identifiziert werden (Abb. 4.20 A, mitte und unten). Die Isotypkontrolle zeigt die Spezifität der Färbung (Abb. 4.20 B). Tregs im KHT-Gewebe exprimieren somit TLR4 und RAGE. Für eine bessere Quantifizierung und den Vergleich zu Teffs, wurden tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) mittels enzymatischer GentleMACS-Technologie aus Tumorgewebestücken isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die bisher verwendete *Gating*-Strategie war für Blutlymphozyten etabliert und nicht unmittelbar auf TILs übertragbar. So zeigte sich z.B., dass Teffs kaum CD127<sup>+</sup> waren. Da bei der mikroskopischen Analyse der Transkriptionsmarker FoxP3 der Diskriminierung zwischen Tregs und Teffs gedient hatte, wurde er nun auch für die adaptierte *Gating*-Strategie herangezogen. Tregs wurden als CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, Teffs als CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> charakterisiert. Es konnten drei Gewebeproben analysiert werden, die stark in ihrem Anteil FoxP3-positiver T-Zellen variierten (Abb. 4.20 C). Die Expressionsstärke von RAGE und TLR4 war auf Tregs und Teffs ähnlich. Es konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass auch tumorinfiltrierende Tregs das Potenzial besitzen auf HMGB1-Signale zu antworten.



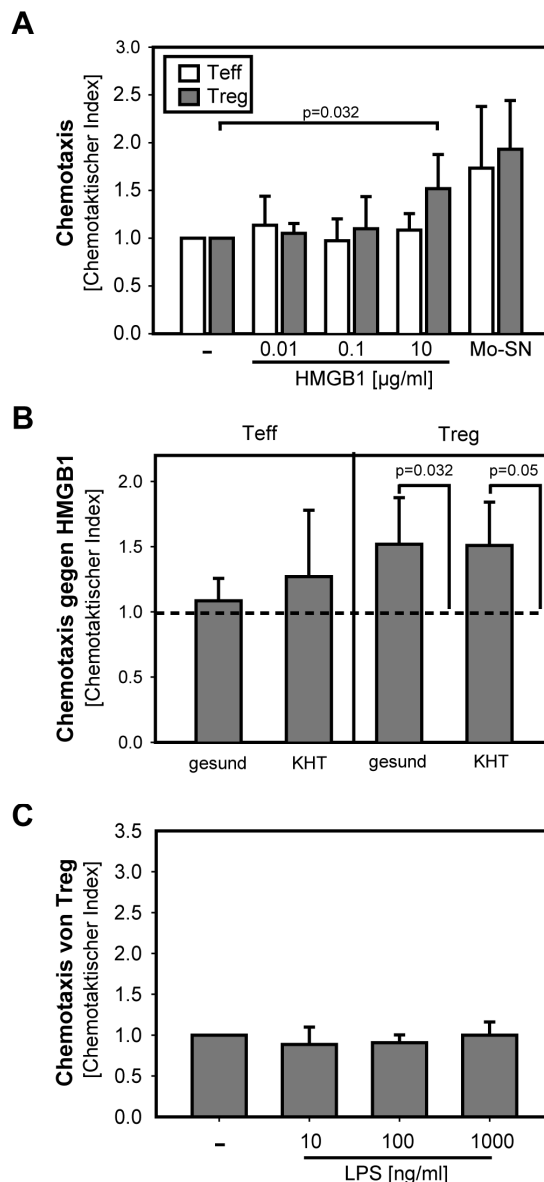


**Abb. 4.20: TLR4 und RAGE sind auf tumorinfiltrierenden Tregs und Teffs exprimiert.** (A) Gefrierschnitte von KHT-Gewebe wurden zur Analyse tumorinfiltrierender Tregs unter Verwendung von Antikörpern gegen FoxP3 (grün), CD4 (rot, oben), RAGE (rot, mitte) und TLR4 (rot, unten) gefärbt. 1 repräsentatives Beispiel von 3 KHT-Gewebe ist abgebildet. (B) Negative Kontrollfärbung der Isotypen plus Sekundärantikörper zeigt Spezifität der Färbung. (C) Tumorinfiltrierende Leukozyten wurden mit Hilfe der GentleMACS-Technologie aus 3 KHT-Gewebe isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Tregs werden in diesem Fall als CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> identifiziert und Teffs als CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>. Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012b.

#### 4.2.3 HMGB1 als Chemoattraktans für Tregs

Eine typische Eigenschaft von HMGB1 ist, als Chemoattraktans für verschiedene Zelltypen zu dienen (Orlova *et al.* 2007). Daher sollte als erstes untersucht werden, ob HMGB1 die

Fähigkeit besitzt, Tregs und Teffs anzulocken. MACS-isolierte  $CD4^+CD25^+$  Tregs und  $CD4^+CD25^-$  Teffs von gesunden Spendern wanderten durch *transwells* mit 5µm Porengröße gegen verschiedene HMGB1-Konzentrationen. Es stellte sich heraus, dass nur Tregs von HMGB1 angelockt wurden (Abb. 4.21 A). Der deutlichste Effekt war bei 10µg/ml zu sehen. Als Kontrolle dafür, dass beide Zellpopulationen zur gerichteten Wanderung fähig waren, diente der Überstand LPS-stimulierter Monozyten. Beide T-Zellsubtypen wanderten *in vitro* gegen diesen Überstand und bestätigt die einwandfreie Wanderungsfunktion von Teffs, die lediglich nicht von HMGB1 angelockt wurden (Abb. 4.21 A).



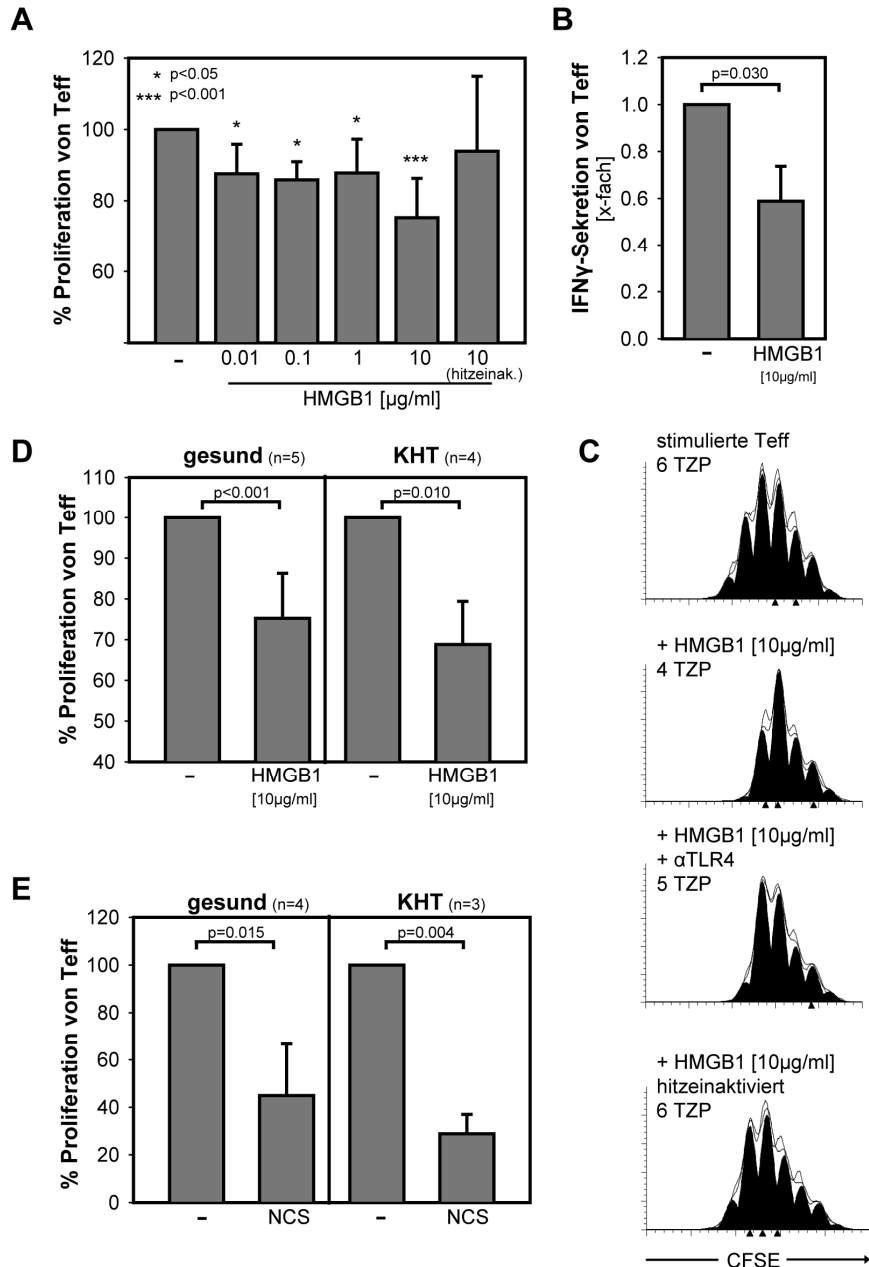
**Abb. 4.21: HMGB1 ist ein Chemoattraktans für Tregs.**  $1,5 \times 10^3$  MACS-isolierte  $CD4^+CD25^+$  Tregs und  $CD4^+CD25^-$  Teffs wanderten für 2,5 Std. gegen HMGB1 wandern. Hierfür wurden 24-well-Platten mit Transwell-Einsätzen, die eine Porengröße von 5 µm besaßen, verwendet. Gewanderte Zellen wurden mittels Casy Counter gezählt. Als Negativkontrolle diente Rxx10, als Positivkontrolle der Überstand LPS-stimulierter Monozyten. (A) Es wurden Zellen von gesunden Spendern verwendet (n=3-5). (B) Es wurden Zellen von KHT-Patienten verwendet (n=4). (C) LPS diente als zusätzliche Negativkontrolle. Es wurden Tregs von KHT-Patienten verwendet (n=3). Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012a und 2012b.

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob Tregs und Teffs, isoliert von KHT-Patienten, ein ähnliches Verhalten zeigten. Auch hier diente der Überstand LPS-stimulierter Monozyten als Positivkontrolle. Tregs von KHT-Patienten wanderten in ähnlichem Ausmaß wie Tregs von gesunden Spendern gegen 10 µg/ml HMGB1. Teffs von KHT-Patienten zeigten eine leicht erhöhte Wanderungsbereitschaft gegen HMGB1 im Vergleich zu Teffs von gesunden Spendern, jedoch ohne statistische Signifikanz. LPS hingegen induzierte keine Migration der Tregs von KHT-Patienten (Abb. 4.21 C).

Dieses Ergebnis lässt auf eine bisher unbekannte immunregulatorische Eigenschaft von HMGB1 schließen, nämlich dergestalt, dass es suppressive Tregs ins Tumorgewebe anlocken kann.

#### **4.2.4 Hemmung der T-Zell-Proliferation durch HMGB1**

Bevor der Effekt von HMGB1 auf die suppressive Wirkung von Tregs untersucht werden konnte, musste zunächst sein direkter Einfluss auf Teffs charakterisiert werden. Es zeigte sich deutlich, dass HMGB1 die Proliferation von Teffs konzentrationsabhängig reduzierte (Abb. 4.22 A). Die größte Hemmung war bei 10 µg/ml zu beobachten. Da das verwendete HMGB1 aus *E.coli* stammte und womöglich LPS-Kontaminationen für einen Effekt verantwortlich gemacht werden könnten, wurde hitzeinaktiviertes HMGB1 als Kontrolle verwendet. LPS ist hitzeresistent und würde seine biologische Wirkung beibehalten. Das verwendete HMGB1 hingegen verlor seine Fähigkeit die Proliferation der T-Zellen signifikant zu blockieren. Auch hemmte LPS selbst die Proliferation nicht (Wild *et al.* 2010). Gleichzeitig mit der Proliferationshemmung geht eine verringerte IFN $\gamma$ -Sekretion einher (Abb. 4.22 B). Bei Blockierung von TLR4 konnte die durch HMGB1-induzierte Proliferationshemmung teilweise aufgehoben werden ( $p=0.037$ ,  $n=5$ ). Abbildung 4.22 C zeigt deutlich die durch HMGB1 und  $\alpha$ -TLR4 beeinflusste Anzahl der Tochterzellpopulationen (TZP). HMGB1 beeinträchtigt also auf vielfältige Weise Teff-typische Eigenschaften.



**Abb. 4.22: HMGB1 und NCS hemmen Funktionen von Teffs.**  $1 \times 10^5$  MACS-isolierte  $CD4^+CD25^-$  Teffs wurden mit CFSE markiert, mit CD2/CD3/CD28 MACSi Partikeln stimuliert und deren Proliferation wurde nach 7 Tagen durchflusszytometrisch gemessen. (A) Der Kultur wurde HMGB1 in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Zusätzlich wurde hitzeinaktiviertes HMGB1 als Kontrolle verwendet. (B) Der Überstand an Tag 7 (10 μg/ml HMGB1) wurde hinsichtlich der IFN $\gamma$ -Konzentration mittels ELISA analysiert (n=4). (C) Teffs wurden 25 min vor Zugabe von 10 μg/ml HMGB1 mit  $\alpha$ -TLR4-Antikörper inkubiert. Hitzeinaktiviertes HMGB1 wurde als Kontrolle verwendet. Histogramme zeigen 1 repräsentatives Experiment von 5. (D) Teffs von KHT-Patienten wurden verwendet. (E) Teffs gesunder Spender und KHT-Patienten wurden in NCS, supplementiert mit FCS, statt Rxx10 kultiviert. Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012a und 2012b.

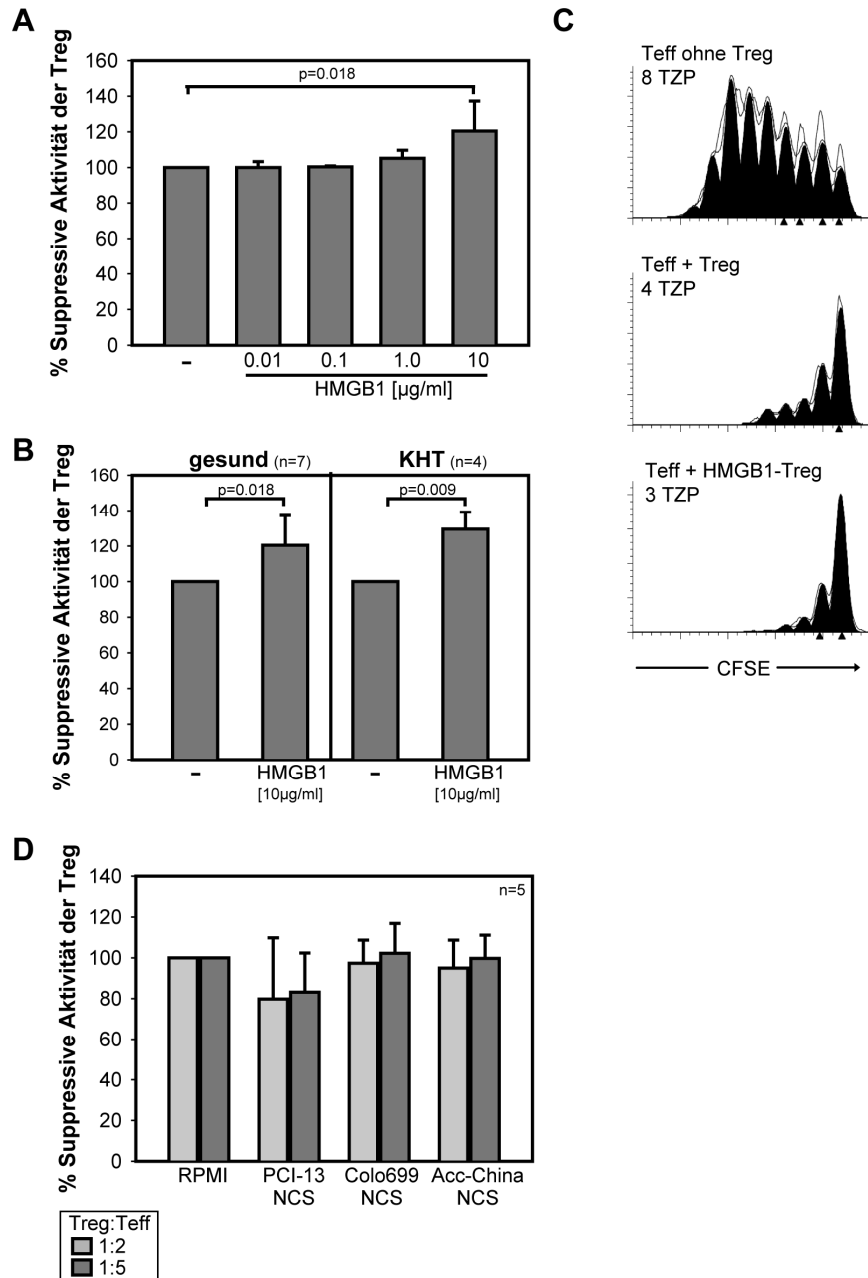
Es stellte sich die Frage, ob HMGB1 diese Wirkung auch bei Teffs aus KHT-Patienten erzielen kann. MACS-isolierte Teffs aus dem Blut von KHT-Patienten wurden unter den

gleichen Bedingungen 10 µg/ml HMGB1 ausgesetzt. Wie bei den gesunden Spendern, zeigte sich auch bei KHT-Patienten eine starke Hemmung der Proliferation von Teffs (Abb. 4.22 D). In einem letzten Schritt sollte mit NCS, der unter anderem natürliches HMGB1 enthält, der beobachtete Effekt verifiziert werden. Hierfür wurden Teffs sowohl von gesunden Spendern als auch von KHT-Patienten in NCS resuspendiert und mit CD2/CD3/CD28 MACSi beads stimuliert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine deutliche Proliferationshemmung durch NCS (Abb. 4.22 E).

Es lässt sich festhalten, dass HMGB1 die bisher unbekannte Eigenschaft besitzt die Funktionen von Effektor-T-Zellen zu hemmen.

#### **4.2.5 Förderung der suppressiven Wirkung von Tregs durch HMGB1**

Da im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, dass HMGB1 direkt hemmende Eigenschaften gegenüber Teffs besaß, musste im Folgenden eine Vorinkubation von Tregs mit HMGB1 vorgenommen werden, um den Effekt von HMGB1 auf Treg-vermittelte Hemmung von Teffs untersuchen zu können. Tregs wurden dann in den Verhältnissen 1:2, 1:5 und 1:10 mit autologen, CFSE-markierten Teffs kokultiviert. Im Verhältnis 1:2 zeigte sich eine Suppressionssteigerung der Tregs, die mit 10 µg/ml HMGB1 vorinkubiert worden waren (Abb. 4.23 A). Daher wurden nachfolgend auch Tregs aus KHT-Patienten mit dieser Menge HMGB1 wie beschrieben stimuliert. Auch hier trat eine Suppressionssteigerung durch HMGB1-Vorinkubation in ähnlichem Maß auf (Abb. 4.23 B). Die repräsentativen Histogramme eines KHT-Patienten in Abb. 4.23 C zeigen deutlich eine durch HMGB1-Treg-vermittelte Reduktion der Tochterzellpopulationen (TZP). Inkubation in NCS konnte die proliferationshemmende Wirkung bei Tregs gesunder Spender jedoch nicht fördern (Abb. 4.23 D).

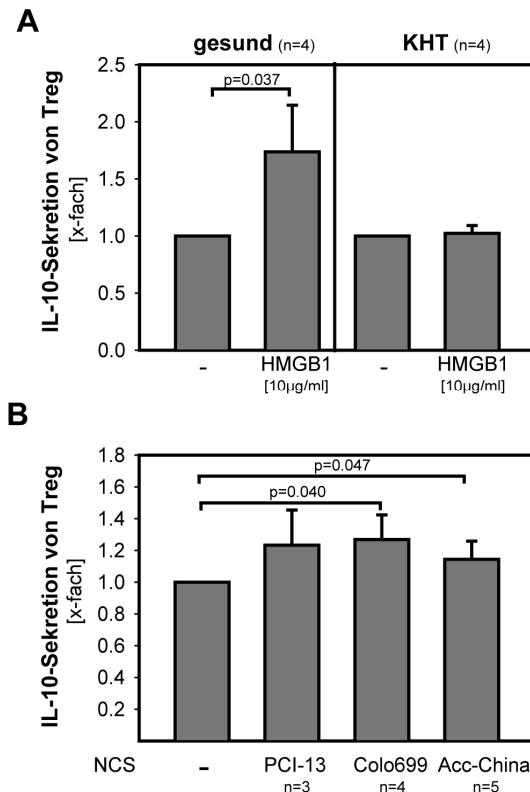


**Abb. 4.23: HMGB1 fördert suppressive Wirkung von Tregs.** (A)  $CD4^+CD25^+$  Tregs wurden für 2,5 Std. in RPMI unter Zugabe von HMGB1 in verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert, gewaschen und über Nacht mit CD2/CD3/CD28 MACSi Partikeln aktiviert. Tregs wurden am Folgetag gewaschen und im Verhältnis 1:2 zu autologen, CFSE-markierten Teffs gegeben. Proliferation von Teffs wurde an Tag 7 durchflusszytometrisch gemessen (n=3-5). (B) Tregs von KHT-Patienten wurden wie in (A) beschrieben mit 10 µg/ml HMGB1 vorstimuliert. (C) Histogramme zeigen 1 repräsentatives Beispiel von 4 KHT-Messungen. (D) Tregs gesunder Spender wurden in NCS, anstelle von RPMI plus HMGB1, vorinkubiert und anschließend genauso prozessiert wie in (A). Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012a und 2012b.

#### 4.2.6 Förderung der IL-10-Sekretion durch HMGB1

Ein Mechanismus Treg-vermittelter Proliferationshemmung ist die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins IL-10. Aus diesem Grund sollte als nächstes untersucht werden,

ob HMGB1 die IL-10-Sekretion von Tregs erhöht, was als Ursache für die verstärkte Proliferationshemmung in Frage kommen könnte. Hierfür wurde der 18-Stunden Überstand HMGB1-stimulierter Tregs auf die IL-10-Konzentration hin mittels ELISA untersucht. Tatsächlich fanden sich im Überstand HMGB1-behandelter Tregs gesunder Spender signifikant erhöhte IL-10-Mengen (Abb. 4.24 A). Tregs von KHT-Patienten reagierten hingegen nicht mit einer erhöhten IL-10-Sekretion auf HMGB1-Stimulation hin. TGF $\beta$  konnte in keinen Überständen nachgewiesen werden.



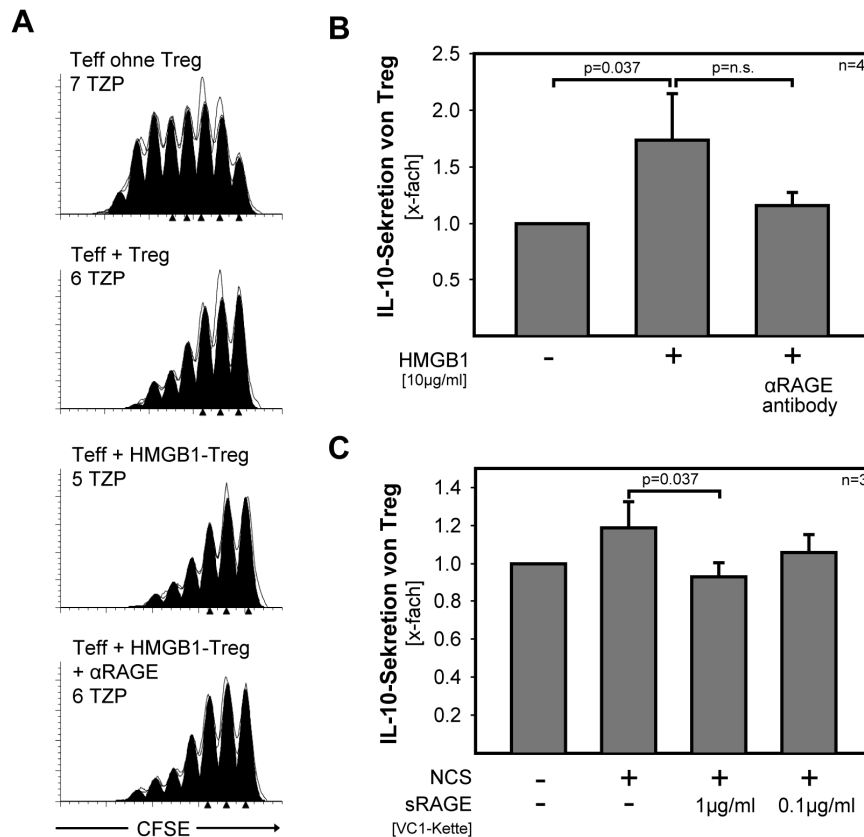
**Abb. 4.24: HMGB1 und NCS fördern IL-10-Sekretion von Tregs gesunder Spender.** (A) Tregs gesunder Spender und von KHT-Patienten wurden wie in Abb. 4.23 (A) beschrieben mit 10 µg/ml HMGB1 und MACSi Partikeln stimuliert. Der Überstand am Folgetag wurde hinsichtlich seiner IL-10-Konzentration mittels ELISA untersucht. (B) Der 18-Stunden-Überstand NCS-stimulierter Tregs (Abb. 4.23 D) wurde hinsichtlich seiner IL-10-Konzentration mittels ELISA analysiert. Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012a.

Auch hier sollte untersucht werden, ob NCS eine Funktionssteigerung in Tregs hervorrufen kann. In der Tat erhöhten Tregs durch NCS-Vorinkubation und nachfolgender MACSi Partikel-Aktivierung die Sekretion von IL-10 (Abb. 4.24 B). Jedoch fiel die Steigerung schwächer aus als nach HMGB1-Stimulation. Dies könnte erklären, warum es nach NCS-Stimulation zu keiner gesteigerten Proliferationshemmung kam.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass HMGB1 und NCS die Funktionen regulatorischer T-Zellen steigern können. Welcher Rezeptor ist hierfür verantwortlich?

#### 4.2.7 RAGE-abhängige Modulation der Funktionen von Tregs durch HMGB1

Wie einleitend erklärt wurde, kann HMGB1 über TLR2, TLR4 und RAGE Signale vermitteln. Da TLR2 auf Tregs nicht nachgewiesen wurde, sollte nun die Rolle von TLR4 und RAGE bei der HMGB1-vermittelten Signaltransduktion untersucht werden. In diesem Kapitel wurden nur Tregs von gesunden Spendern verwendet. Zunächst wurde die HMGB1-abhängige Suppressionssteigerung näher betrachtet.



**Abb. 4.25: RAGE-Ligation fördert Funktionen von Tregs.** Tregs gesunder Spender wurden 25 min bevor sie mit 10 µg/ml HMGB1 stimuliert wurden, mit einem α-RAGE-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde prozessiert wie in Abb. 4.23 A erklärt. (A) Histogramme zeigen 1 repräsentatives Experiment von 5. (B) IL-10-Konzentrationen wurden in den 18-Stunden-Überständen der unter (A) beschriebenen Tregs mittels ELISA gemessen. (C) Tregs wurden für 0,5 Stunden im NCS von Acc-China in Anwesenheit der löslichen VC1-Kette des RAGE-Rezeptors inkubiert, gewaschen und über Nacht mit MACSi Partikeln aktiviert. Der 18-Stunden-Überstand wurde hinsichtlich seiner IL-10-Konzentration analysiert. Abgebildet ist der Mittelwert ± SD. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0.05$  erreicht (Student's t-Test). Veröffentlicht in Wild *et al.* 2012a.

Interessanterweise zeigte sich, dass der α-RAGE-Antikörper die HMGB1-vermittelte Suppressionssteigerung aufhob (Abb. 4.25 A,  $p=0.05$ ,  $n=4$ ), während TLR4 zu keiner signifikanten Änderung führte (nicht gezeigt).



Welche Rolle spielt RAGE bei der HMGB1-vermittelten IL-10-Sekretion? Der  $\alpha$ -RAGE-Antikörper konnte die HMGB1-vermittelte Sekretionssteigerung von IL-10 in allen Versuchsläufen hemmen, jedoch ohne ein Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 4.25 B). Zur Hemmung von HMGB1 und generell RAGE-Liganden im NCS wurde die rekombinante VC1-Kette des löslichen RAGE-Proteins verwendet. In der Tat gelang es der VC1/sRAGE-Kette die durch NCS induzierte IL-10-Sekretion von Tregs signifikant zu blockieren (Abb. 4.25 C).

Diese Ergebnisse lassen das Fazit zu, dass RAGE und RAGE-Liganden einen bisher unbekannten Einfluss auf die Funktion von regulatorischen T-Zellen besitzen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

#### 5.1.1 Extrazelluläre und intrazelluläre Gabe von Poly(I:C)

Die Arbeit untersucht die immunologische Tumor-Wirt-Interaktion nach Poly(I:C)- und Imiquimod-Behandlung von Tumorzellen. Essentiell war hierbei, dass Poly(I:C) nur durch direkten Transport in das Zytosol zum Absterben der Zellen führte. Dies ist vermutlich auf die Aktivierung des zytosolischen Rezeptors MDA5 zurückzuführen (s.a. Kapitel 1.4.4). Alle Versuche hätten prinzipiell auch mit exogen zugeführtem Poly(I:C) durchgeführt werden können, hierbei wäre jedoch kein Zelltod in FaDu induziert worden.

Wird Poly(I:C) endozytotisch aufgenommen, was eine TLR3-Aktivierung zur Folge hat, wird in den seltensten Fällen direkt Apoptose induziert (Salaun *et al.* 2006). In der Regel werden Zellen nur für ein proapoptotisches Signal sensibilisiert bzw. bedarf es der weiteren Aktivierung zusätzlicher Signalweg (Friboulet *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2008; Weber *et al.* 2010). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass in Zelllinien aus KHT-Metastasen mit defektem NFκB-Signalweg Poly(I:C) durchaus alleine über TLR3-Aktivierung Apoptose induzieren kann (Umemura *et al.* 2012). Je nach Zelllinie vermag Poly(I:C) auch eine unterschiedliche Zytokinsekretion zu induzieren (Jiang *et al.* 2008; Salaun *et al.* 2006). Die Datenlage weist darauf hin, dass wenn Zelltod induziert wird, ob über TLR3 oder MDA5, auch Zytokinausschüttung erfolgt. Wirkt die gewählte Behandlung nicht cytotoxisch, werden auch weniger oder kaum Zytokine freigesetzt (Jiang *et al.* 2008; Kubler *et al.* 2011; Salaun *et al.* 2006). Ob die Zytokinfreisetzung eine Folge der frühen Rezeptoraktivierung ist oder aber Folge des Zellsterbens und Freilassens der intrazellulären Komponenten ist nicht geklärt. Da in der vorliegenden Arbeit exogen zugeführtes Poly(I:C) keinen Zelltod in FaDu und weiteren getesteten Tumorzelllinien hervorrief (Daten nicht gezeigt), jedoch eine Immunaktivierung durch PRR-induzierten Tumorzelltod analysiert werden sollte, wurde ausschließlich die Elektroportationsmethode für die Poly(I:C)-Versuche gewählt.

#### 5.1.2 Komplexe Kokultur aus Tumorzellen, Zelltrümmern und Immunzellen

Die in Kapitel 4.1 beschriebenen Versuche untersuchen den Effekt von vorbehandelten Tumorzellen auf Immunzellen. Bedingt durch die gewählte Stimulationsmethode, die verschiedene Waschschrte zu gegebenen Zeitpunkten beinhaltete, ist es hoch-

unwahrscheinlich, dass PRR-Liganden nachfolgend auf die Immunzellen wirkten. Außerdem sind für Monozyten und NK-Zellen, meines Wissens nach, keine Effekte von Imiquimod und Poly(I:C) beschrieben (siehe Kapitel 1.4.3 und 1.4.4). Die PRR-Aktivierung führte in beiden Fällen zu einem 50%-igen Zelltod. Der Ansatz bestand nun aus lebenden und toten Tumorzellen. Ab hier kann nicht mehr unterschieden werden, ob die beobachteten Effekte von den behandelten überlebenden Zellen oder den toten Zellen stammte.

In Kapitel 4.1.2.1 werden NK-Zellen zu einer Mischung aus lebenden und toten Zellen hinzugegeben. Da für den NK-Degranulationsversuch die Tumorzellen geerntet und gewaschen wurden, wurde hierbei primär der Effekt der lebend/tod-Mischung, unabhängig von Zytokinmilieu, auf NK-Degranulation untersucht. Die Kokultur wurde so gewählt, dass in beiden Ansätzen, behandelt und unbehandelt, eine NK-Zelle auf eine lebende Tumorzelle kam. Zweifach-Färbungen von MHC-I mit 7-AAD haben aufgedeckt, dass MHC-I sowohl auf 7-AAD<sup>+</sup> als auch 7-AAD<sup>-</sup> Zellen in gleicher Weise reguliert wurde (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte MHC-I-Expression nach Poly(I:C)-Behandlung kann Ursache für die reduzierte NK-Degranulation sein. Doch warum führt die Imiquimod-induzierte Herunterregulation nicht zu einer gesteigerten NK-Aktivierung? Interessanterweise konnte bereits in den 80er Jahren gezeigt werden, dass die NK-Zellaktivität und -Degranulation durch bereits lysierte Zellen gehemmt wird (Abrams and Brahmi 1986; Brahmi *et al.* 1985). 2010 konnte gezeigt werden, dass dies über Phosphatidyl-Serin-Reste hervorgerufen wird (Chong *et al.* 2010). Dies wäre physiologisch insofern sinnvoll, als eine überschießende NK-Degranulation verhindert und die Freisetzung lytischer Proteine reduziert wird. Somit wäre eine Schädigung von umliegendem, gesundem Gewebe verhindert. Leider tritt diese NK-Hemmung auch durch Zelltrümmer von Tumorzellen auf, was einen Effektorarm der antitumoralen Immunität, wie hier *in vitro* bewiesen, hemmt.

In Kapitel 4.1.2.2 werden Monozyten zu Poly(I:C)- und Imiquimod-behandelten FaDu-Zellen hinzugegeben. Die Immunzellen treffen also auf eine Mischung aus lebenden und toten Tumorzellen sowie verschiedenen Zytokinen. Da keine inhibitorischen Antikörper, die gegen bestimmte Zytokine gerichtet sind, verwendet wurden, kann der genaue monozytenaktivierende Mechanismus nicht geklärt werden. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, ist genau dieses Zusammenspiel verschiedener Faktoren für die Richtung der Immunantwort entscheidend. Vor allem was die Induktion regulatorischer Makrophagen vom Typ M2, denen eine pro-tumorale Wirkung zugesprochen wird, betrifft, scheinen lösliche Faktoren wie IL-10, TGF $\beta$  und Sphingosin-1-Phosphat eine wichtige Rolle zu spielen (Weigert *et al.* 2009). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass Imiquimod-

Behandlung keine Monozyten-Aktivierung hervorruft, wäre es spannend zu untersuchen, ob M2-polarisierende Prozesse auftreten können. Des Weiteren wäre von Interesse, ob sich der unterschiedliche Aktivierungsstatus der Monozyten auch in ihrer Phagozytose-Bereitschaft niederschlagen würde.

In Kapitel 4.1.2.3 wurde CXCL-10-reicher Überstand Th1-Zellen zur Migration zur Verfügung gestellt. Der Nachweis eines CXCL-10-typischen Effekts mittels eines CXCL-10-reichen Überstands beweist nicht, dass CXCL-10 für das beobachtete Ergebnis verantwortlich ist. Dies hätte nur durch die Verwendung eines CXCL-10-blockierenden Antikörpers nachgewiesen werden können. Außerdem kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob das CXCL-10 aus der Ko-kultur von den Monozyten oder den FaDu-Zellen stammt. Hierfür hätte mit siRNA die CXCL-10-Produktion in den Monozyten blockiert werden müssen. Diese Technologie ist jedoch bei Primärzellen noch kaum etabliert und führt zu unbefriedigenden Ergebnissen.

Gleichzeitig stellt die Komplexität der Kokultur eine Stärke der vorliegenden Arbeit dar. Sie simuliert ein Gesamtbild der *in vivo* Situation, bei der alle Komponenten zeitgleich und räumlich aufeinander treffen.

### 5.1.3 Therapieschema im Mausmodell

Das Ziel der Tierversuche war es, die *in vitro* beobachteten Effekte in einer komplexen *in vivo* Umgebung zu untersuchen. Hierfür wurden Nacktmäuse gewählt, die aufgrund eines fehlenden Thymus und somit ausbleibender T- und B-Zell-vermittelter adaptiver Immunität für ein Xenograft-Modell mit humanen Tumorzellen geeignet sind. Monozyten und NK-Zellen sind jedoch vorhanden und funktionstüchtig.

Die Wirkung von Poly(I:C) und Imiquimod auf Zelltod und MHC-I-Regulation konnte *in vivo* bestätigt werden. Dies sind schnell stattfindende Prozesse, die auch *in vitro* nach kurzer Inkubationszeit (ab 24 Stunden) beobachtet wurden. Die *in vitro*-Versuche mit Endothelzellen zeigten eine Tendenz dahingehend, dass CXCL-10 armer Überstand, der durch Kokultur Imiquimod-behandelter Tumorzellen und Monozyten generiert wurde, die Proliferation von Endothelzellen förderte. Es sollte *in vivo* überprüft werden, ob die intratumorale Injektion von Imiquimod den gleichen Effekt zeigt. Bei diesem Weg der Applikation ist zu beachten, dass die PRR-Liganden direkt auf Tumor-, Immun- und Endothelzellen wirken können. Gleichzeitig kann man davon ausgehen, dass der Stimulus nicht dauerhaft im Gewebe

vorliegt, sondern zeitnah von umliegenden Zellen aufgenommen und abgebaut wird. Die (Neo-)Angiogenese ist jedoch ein Prozess, der Tage bis Wochen in Anspruch nimmt. Um die Hypothese zu überprüfen, hätte die Administration über einen längeren Zeitraum stattfinden müssen, wie es bei der experimentellen Analyse von angiogenesebeeinflussender Stoffe üblich ist (Sitohy *et al.* 2011). Das Ausbleiben eines langfristigen Effekts schließt daher nicht aus, dass Poly(I:C)- oder Imiquimod-getötete Tumorzellen das Endothelwachstum beeinflussen. Der *in vitro*-Ansatz ist ein extrem vereinfachtes Modell, das vielerlei Effekte im festen Gewebeverband vernachlässigt. Ein adaptiertes Therapieschema ist notwendig, um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen. Außerdem muss erwähnt werden, dass die Gruppengröße von nur drei Mäusen lediglich starke Änderungen aufdecken kann.

#### **5.1.4 HMGB1-Quelle**

Für die T-Zell-Stimulationsansätze wurde in erster Linie rekombinantes HMGB1 aus *E.coli* verwendet. Die in der Vergangenheit HMGB1 zugesprochenen proinflammatorischen Eigenschaften werden mittlerweile auf LPS-Kontaminationen zurück geführt (Rouhiainen *et al.* 2007;Tsan 2011). Zum Nachweis, dass beobachtete Effekte durch HMGB1 und nicht durch Kontaminationen vermittelt wurden, wurde eine 20-minütige Erhitzung des Stimulus auf 100 °C vorgenommen. LPS ist hitzeresistent und behält seine Wirkung nach dem Kochen, HMGB1 verliert seine Funktion (Youn *et al.* 2008). Diese Methode wurde bei der T-Zell-proliferation verwendet. Die durch HMGB1-vermittelte Hemmung konnte durch Kochen größtenteils, jedoch nicht komplett aufgehoben werden. Dies lässt auf eine Restaktivität eines weiteren Bestandteils schließen. Hier schließen sich die Fragen an: besitzt „nacktes“ HMGB1 überhaupt eine biologische Aktivität? Wirkt es alleine schwach, aber in Kombination stark (Bianchi 2009)? Ist es ein eigenständiges Zytokin oder nur Transportprotein (Tsan 2011)? Während der Entstehung dieser Arbeit festigte sich in der Fachwelt die Meinung, dass HMGB1 *in vivo* nicht frei, sondern aufgrund seiner reaktiven Eigenschaften als Komplex mit anderen (nukleären) Molekülen wie z.B. DNA vorliegt (Bianchi 2009). Aus diesem Grund und um den potenziellen Effekt bakterieller Kontaminationen zu beseitigen wurden Versuche mit NCS, der als natürliche HMGB1-Quelle gilt, durchgeführt. Die Mehrheit der mit rekombinantem HMGB1 erzeugten Ergebnisse konnten mit NCS reproduziert werden. Alternative Ansätze wären gewesen HMGB1 aus einer eukaryotischen Quelle zu verwenden (Rouhiainen *et al.* 2007), HMGB1-freien NCS mit HMGB1-haltigem NCS zu vergleichen (Cassetta *et al.* 2009) oder rekombinantes HMGB1 mit CpG-ODN zu mischen, um die komplexe Wirkweise von HMGB1 ganzheitlich besser zu erfassen.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Mustererkennungsrezeptoren auf Tumorzellen und Tregs

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRR-Aktivierung auf Tumorzellen Zelltod induzierte, während PRR-Ligation auf Tregs zu deren Aktivierung führte. Die Aktivierung verschiedener PRRs auf Tumor- und Immunzellen muss differentiell betrachtet werden.

So konnte gezeigt werden, dass TLR2-, 3-, 4-, 5-, 7- und 9-Aktivierung in multiplen Myelomzellen die Proliferation fördert, Arzneimittelresistenz durch einen autokrinen Mechanismus, der IL-6-Sekretion involviert, induziert und Veränderungen hervorruft, die das Immunsystem hemmen oder eine Immunerkennung verhindern (Bohnhorst *et al.* 2006;Chiron *et al.* 2009b;Chiron *et al.* 2009a;Jego *et al.* 2006;Liu *et al.* 2007a). Gleichzeitig waren die Effekte zelllinienabhängig und können nicht verallgemeinert werden, da ebenso Proliferation gehemmt und Apoptose induziert wurden (Bohnhorst *et al.* 2006;Chiron *et al.* 2009a). Auch in soliden Tumoren wurden ähnliche Beobachtungen gemacht.

TLR9-Aktivierung zeigt hierbei einen ambivalenten Charakter. CpG DNA förderte bei benignen Prostataepithelzellen die Proliferation und reduzierte die Suzeptibilität gegenüber proapoptotischen Signalen (Kundu *et al.* 2008). Zelllinien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms hingegen reagieren auf TLR9-Aktivierung mit Wachstumsstopp und erhöhter Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika (Wang *et al.* 2006).

Flagellin, ein TLR5-Ligand wirkt proliferationsfördernd auf Fibroblasten (Hasan *et al.* 2005). Cai und Kollegen zeigten 2011 eine verstärkte Expression von TLR5 bei Brustkrebs (Cai *et al.* 2011). Flagellin wirkte in diesem Fall jedoch antiproliferativ auf Brustkrebszelllinien und hemmte Kolonienbildung. In einem murinen Xenograft-Tumormodell konnte die Verabreichung von Flagellin sogar das Tumolvolumen reduzieren.

Eine Poly(I:C)-Stimulation maligner Zelllinien wirkt über TLR3- und MDA5-Aktivierung auf diese proliferationshemmend und apoptoseinduzierend, wie in Kapitel 1.4.4 ausführlich erklärt wurde. Interessanterweise sind diese Effekte von Poly(I:C) vor allem in entarteten Zellen verschiedenster Entitäten zu beobachten, nicht jedoch bzw. zu einem vermindertem Anteil in gesunden Zellen (Besch *et al.* 2009;Friboulet *et al.* 2010;Hirabayashi *et al.* 1999). Gesunde Zellen besitzen häufig eine verminderte Rezeptorexpression und -hochregulierung auf Poly(I:C)-Stimulation hin im Vergleich zu malignen Zellen (Friboulet *et al.* 2010;Peng *et al.* 2009). Dies scheint jedoch für ein Ansprechen auf Poly(I:C) notwendig zu sein und könnte

die schwächere bzw. ausbleibende Wirkung von Poly(I:C) auf gesunde Zellen erklären. Auf Fibroblasten wirkt Poly(I:C) bei gleichzeitiger Blockade von Typ I IFN sogar proliferationsfördernd (Hasan *et al.* 2005). Inwieweit TLR3 *in vivo* an der Tumorgenese beteiligt ist bleibt dennoch zu klären. Es konnte gezeigt werden, dass TLR3-Expression in KHT zur c-Myc-Expression beiträgt und ein knock-down *in vitro* verminderte Zellproliferation zur Folge hat (Pries *et al.* 2008). Chuang und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass TLR3-Expression in 73% der untersuchten KHT-Gewebe überexprimiert war (Chuang *et al.* 2012). Die erhöhte Expression korrelierte signifikant mit geringem Differenzierungsgrad sowie perineuraler Invasion. Der pro- oder antitumorale Ausgang einer PRR-Aktivierung in Tumorzellen ist demnach abhängig von der Tumorentität, dem PRR-Status und dem PRR-Liganden.

Die Datenlage über Aktivierung von Tregs und Teffs mittels PRRs ist auf den ersten Blick genauso kontrovers.

Aktivierung von TLR5 auf humanen Tregs mittels Flagellin erhöhte deren suppressive Wirkung (Crellin *et al.* 2005). Der synthetische TLR2-Ligand Pam3Cys-SK4 expandierte sowohl Tregs als auch Teffs (Liu *et al.* 2006a; Suttmüller *et al.* 2006). Während Tregs jedoch vorübergehend ihre suppressive Wirkung verloren, wurden Teffs sogar resistent gegenüber Treg-vermittelter Suppression. Stimulation von Tregs mit synthetischen als auch natürlichen TLR8-Liganden hob deren suppressive Wirkung auf (Peng *et al.* 2005). Adoptiver Transfer von TLR8-aktivierten Tregs in tumortragende Mäuse trug zu einer effektiven antitumoralen Immunantwort bei. Es muss darauf geachtet werden humane und tierexperimentelle Daten getrennt voneinander zu betrachten. So konnte Chiffolleau zeigen, dass TLR9-Aktivierung die Expansion von murinen Tregs und Teffs förderte und die suppressive Wirkung von Tregs vorübergehend aufhob (Chiffolleau *et al.* 2007). Suttmüller *et al.* jedoch konnten keine Wirkung von CpG auf humane Tregs feststellen (Suttmüller *et al.* 2006). Nur durch Vitamin D3 induzierte TLR9-Expression in humanen Tregs und nachfolgende Stimulation mit CpG ODN konnte deren suppressive Wirkung vorübergehend aufgehoben werden (Urry *et al.* 2009). In einer Mausstudie von Anz und Kollegen konnte gezeigt werden, dass virale Infektionen, simuliert durch synthetische RNA-Oligonukleotide, die Funktion von Tregs hemmten (Anz *et al.* 2010). Dies geschah über TLR7-Aktivierung in APCs und nachfolgende IL-6-Sekretion. Interessanterweise konnte auch ein direkter Link zwischen Virusinfektion und Treg-Hemmung beobachtet werden. Die Rezeptorspezifischen Viren Sendai Virus (RIG-I) und der Encephalomyocarditis-Virus (MDA5) wurden in entsprechende knock-out Mäuse injiziert. Die Autoren konnten feststellen, dass in beiden Fällen Tregs ihre suppressive

Wirkung verloren (Anz *et al.* 2010). Dies waren direkte Effekte und nicht z.B. über DCs vermittelt. Im Fall der Infektion mit Encephalomyocarditis-Virus musste auch MDA5 in Teffs aktiviert werden.

Vor diesem Hintergrund bekommen Nukleinsäure-Analoga, darunter Poly(I:C), als Chemotherapeutika/Adjuvantien eine ganz neue Bedeutung. In einer Mausstudie führte die intraperitoneale Verabreichung von Poly(I:C) zu einer DC/IL-6-vermittelten nTreg-Expansion (Kubota *et al.* 2010). Im Kulturüberstand bereitgestelltes Poly(I:C) besaß hierbei jedoch keinen direkten Effekt auf die Treg-Proliferation (Kubota *et al.* 2010).

Der endogene TLR2-Ligand HSP60 hingegen führte zu einer Aktivierung von humanen Tregs, was sich in einer gesteigerten Sekretion von IL-10 und TGF $\beta$  und gesteigerter Suppression der Teff-Proliferation ausdrückte (Zanin-Zhorov *et al.* 2006). Liu und Kollegen konnten kürzlich in einer Mausstudie zeigen, dass tumorales HMGB1 die IL-10-Produktion von Tregs und die nachfolgende Hemmung einer CD8-Antwort förderte (Liu *et al.* 2011). Diese Publikationen zusammen mit den hier vorgelegten Daten weisen auf eine Aktivierung von Tregs durch proteinerge DAMPs und somit einer weiteren Achse des DAMP-vermittelten Tumor-Immun-*Escape* hin (s.a. Kapitel 1.3.1 und 5.2.3). Aktivierung von (cytosolischen) Nukleinsäure-erkennenden Rezeptoren in Tregs hingegen scheint deren Funktion eher zu inhibieren. Umfangreiche vergleichende Studien liegen, meines Wissens nach, bis dato noch nicht vor.

### **5.2.2 Treg-Hemmung in der Krebstherapie**

Die zuvor diskutierten Daten werfen einige Fragen auf. Wenn Tregs durch tumorale DAMPs sowie andere Faktoren aktiviert werden, welche Immunzellen werden dann gehemmt? Wie können Tregs gezielt bei der Tumorthherapie manipuliert werden und kommt es hierbei zum erwarteten Erfolg?

Fünf Hauptmechanismen der Treg-vermittelten Suppression wurden identifiziert. Tregs können über Sekretion suppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF $\beta$ , das auch oberflächengebunden auftreten kann, die Proliferation und Funktion von T-Zellen (Strauss *et al.* 2007a) sowie DCs (Misra *et al.* 2004) und NK-Zellen hemmen (Ghiringhelli *et al.* 2005a). Auch das Oberflächenmolekül Galectin-1 auf Tregs kann T-Zellproliferation hemmen (Garin *et al.* 2007). Durch stärkere Expression der IL-2 Rezeptorketten  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  (CD122) und  $\gamma$  (CD132) zeigen Tregs eine hohe Affinität zu IL-2 und verbrauchen dieses, das dann als Überlebenssignal für CD4<sup>+</sup> T-Zellen fehlt und in diesen eine Bim-vermittelte Apoptose auslöst (Pandiyani *et al.* 2007). Tregs können mittels Granzyme/Perforin sowie Fas-FasL-



Interaktion in NK-, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> oder CD14<sup>+</sup> Zellen Apoptose induzieren (Cao *et al.* 2007;Grossman *et al.* 2004;Strauss *et al.* 2009). Mit Hilfe der Ectonukleotidase CD39 auf der Zelloberfläche von Tregs hydrolysieren sie ATP oder ADP zu AMP (Mandapathil *et al.* 2010). Auf diese Weise hemmen sie gleich doppelt. Freigesetztes Adenosin hemmt über Aktivierung des A2A-Rezeptors auf T-Zellen deren Proliferation (Deaglio *et al.* 2007). Zum anderen wird die Konzentration an ATP reduziert. Dieses wiederum gilt als DAMP, das die Reifung von DCs und nachfolgende T-Zellaktivierung initiiert (Aymeric *et al.* 2010;Schnurr *et al.* 2000). Treg können auch durch Moleküle auf ihrer Oberfläche DCs hemmen. Das *lymphocyte activation gene-3* (LAG-3), ein CD4-homologes Molekül auf der Treg-Oberfläche bindet mit hoher Affinität MHC-II auf unreifen DCs und hemmt deren Aktivierung (Liang *et al.* 2008). Durch die LFA-1<sup>3</sup>-vermittelte Interaktion von Treg mit DCs schirmen sie diese vor Effektor-T-Zellen ab und führen in einem zweiten Schritt LFA-1- und CTLA-4<sup>4</sup>-vermittelt zu einer Runterregulation der kostimulatorischen Signalmoleküle CD80/CD86 (Onishi *et al.* 2008). Zusätzlich erhöht die Bindung von CTLA-4 an CD80/CD86 die Bildung von Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) in DCs. IDO katalysiert Tryptophan. IDO<sup>+</sup> DCs senken somit die extrazellulären Tryptophanlevel und setzen Metabolite frei, was gemeinsam antigenspezifische T-Zellen hemmt und gleichzeitig Tregs induziert (Chung *et al.* 2009;Fallarino *et al.* 2006). In der vorliegenden Arbeit konnten erhöhte IL-10-Konzentrationen im Überstand HMGB1-stimulierter Tregs gesunder Spender gemessen werden, die vermutlich für die verminderte Proliferation autologer Teffs verantwortlich waren. Tregs von KHT-Patienten reagierten nicht auf HMGB1-Stimulation hin mit verstärkter IL-10-Sekretion. Die erhöhte suppressive Wirkung muss demnach auf andere Veränderungen, wie oben erklärt, zurück zu führen sein.

Generell häufen sich in jüngster Zeit Daten, welche zu einer Neuinterpretation bisher geglaubter Fakten anhalten. So konnte die Gruppe um Oft 2011 zeigen, dass IL-10 gar nicht ausschließlich protumoralen Charakter aufweist, sondern für eine effektive CD8- und IFN $\gamma$ -abhängige Tumorüberwachung verantwortlich ist (Mumm *et al.* 2011). Genausowenig haben Tregs ausschließlich negative Auswirkungen. Unsere Gruppe konnte vor kurzem zeigen, dass iTregs die Aktivität von NK-Zellen fördern können, was in einer verstärkten Lyse von Tumorzellen resultierte (Bergmann *et al.* 2011b). Dies könnte erklären, warum in einigen Publikationen eine hohe Treg-Prävalenz mit verbesserter Überlebensrate korrelierte (Alvaro *et al.* 2005;Carreras *et al.* 2006;Correale *et al.* 2010;Salama *et al.* 2009). Auch bei KHTs konnte

---

<sup>3</sup> *leukocyte function-associated antigen-1*

<sup>4</sup> *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*

eine positive Korrelation zwischen Infiltration von Tregs und lokoregionärer Rezidivfreiheit beobachtet werden (Badoual *et al.* 2006). Die Autoren schlossen daraus, dass Tregs inflammatorische, tumorantreibende Prozesse unter Kontrolle halten würden.

Ob Tregs nun gut oder schlecht für den Wirt sind, sollte durch Experimente, in denen diese Zellen aus dem Organismus entfernt werden, geklärt werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten dies in der Maus und beim Menschen zu bewerkstelligen:

1. Depletion. 2. Wanderung behindern. 3. Differenzierung und Aktivierung hemmen (Zou 2006). Applikation CD25-spezifischer Antikörper konnte in vielen murinen Studien die Tumorlast senken, jedoch nicht in allen (Onizuka *et al.* 1999). Beim Menschen ist das Fusionsprotein Denileukin difitox (Ontak®) seit 1999 bei kutanen T-Zelllymphomen und -Leukämien von der FDA zugelassen. Hierbei ist IL-2 mit der enzymatisch aktiven ADP-ribosyltransferase Domäne des Diphtheria Toxins fusioniert (Foss 2000). Es wird über CD25 von der Zelle aufgenommen, wo es die Proteinsynthese inhibiert und zu Apoptose führt. Einmalige Denileukin difitox-Gabe konnte die Anzahl von Tregs bei Krebspatienten (Ovar, Niere) reduzieren und sogar eine Immunaktivierung, sowie klinisches Ansprechen einer Patientin messen (Barnett *et al.* 2005; Dannull *et al.* 2005). Beim Melanom hingegen führte Treg-Depletion zu keinem klinischen Benefit (Attia *et al.* 2005). In Mausstudien konnte gezeigt werden, dass eine 70%-ige Treg-Depletion, wie sie mittels eines CD25-Antikörpers erreicht wird, nicht für einen klinischen Effekt ausreicht (Li *et al.* 2010). 90% Treg-Depletion sind für eine Tumorregression notwendig. Allerdings begibt man sich hier auf einen gefährlichen Balanceakt, da das gleichzeitige Auftreten von Autoimmunerkrankungen bei dieser Depletionseffizienz favorisiert werden könnte. Auch das Tumorstadium ist für den Erfolg der Treg-Depletion ausschlaggebend: Zhang und Kollegen konnten zeigen, dass Treg-Depletion nur in frühen Tumorstadien die Tumorprogression verhindern konnte, zu einem späteren Zeitpunkt das Tumorwachstum hingegen begünstigte (Zhang *et al.* 2010). Als Grund hierfür nannten die Autoren das verstärkte Auftreten von MDSCs als Folge der Langzeitdepletion der Tregs.

Unter welchen Umständen Treg-Depletion sinnvoll ist und wann nicht bedarf noch intensiver Forschung. Als Teil eines komplexen Therapieschemas hat sie sich jedoch schon durchaus als sehr hilfreich erweisen.

### **5.2.3 TLR4: pro- oder antitumoral?**

TLR4-Ligation auf Tumorzellen kann direkt deren Überleben, Proliferation und Metastasierung fördern, sowie eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und

Immunzellen ermöglichen. Dies konnte am Beispiel von Brustkrebs (Liao *et al.* 2011), Ovarialkarzinom (Kelly *et al.* 2006;Szajnik *et al.* 2009), Prostatakarzinom (Kundu *et al.* 2008) und KHT (Szczepanski *et al.* 2009) gezeigt werden. Diese Ergebnisse stammen aus Untersuchungen mit dem exogenen Liganden LPS. Doch vor dem Hintergrund, dass auch DAMPs wie aktivierte Hyaluronsäure (Taylor *et al.* 2007), S100A8/9 (Foell *et al.* 2007) und HMGB1 an TLR4 binden, wird diese Erkenntnis in ein ganz anderes Licht gerückt. Tatsächlich konnten Liao und Kollegen die protumorale Wirkung endogener TLR4-Liganden aus NCS<sup>5</sup> für Brustkrebswachstum und -metastasierung in ihrer Studie zeigen (Liao *et al.* 2011). Demnach erhält sowohl eine bakterielle Infektion ein malignes Geschehen, als auch nekrotischer Tumorzelltod in einem positiven Feedback-Effekt, der Überleben und Wachstum der restlichen Tumorzellen fördert. Diese Hypothese wird bestätigt, da TLR4-negative Tumorzellen (siRNA) in murinen Tumormodellen eingeschränktes Wachstum zeigten (Huang *et al.* 2005).

Zusätzlich kann TLR4-Aktivierung auf Immunzellen das Tumorstadium begünstigen; zum einen, weil Tregs aktiviert werden können (Caramalho *et al.* 2003;Lewkowicz *et al.* 2006;Wild *et al.* 2010) und zum anderen, weil TLR4-Aktivierung den TCR-Signalweg auf murinen Teffs hemmt (Gonzalez-Navajas *et al.* 2010). Dies kann auch die durch HMGB1 induzierte TLR4-abhängige Proliferationshemmung erklären, die in dieser Arbeit beobachtet wurde. Diese Effekte scheinen jedoch *in vivo* beim Menschen eine untergeordnete Rolle zu spielen, da bestimmte TLR4-Varianten mit schlechterem Überleben assoziiert sind. Hierfür einige Beispiele: das Auftreten einiger Lymphome korrelierte mit Einzelnukleotid-Polymorphismen der Rezeptoren TLR1, 2, 4, 5, 9 (Nieters *et al.* 2006). Auch solide Tumore sind betroffen. Mutationen in den TLRs 1, 4, 6 und 10 waren mit Prostatakrebs vergesellschaftet (Chen *et al.* 2005;Sun *et al.* 2005). TLR4- und 10-Varianten waren mit verstärktem Auftreten von Tumoren im Nasopharynx assoziiert (Song *et al.* 2006;Zhou *et al.* 2006). Auch die TLR4-Einzelnukleotid-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile korrelierten mit schlechterem Überleben und Therapieansprechen bei KHT-Patienten (Bergmann *et al.* 2011a). Diese TLR4-Varianten zeigten reduzierte Affinität für HMGB1 (Apetoh *et al.* 2007). Ursache hierbei ist vermutlich, dass TLR4-Aktivierung auf DCs durch HMGB1 essentiell für Tumorantigenaufnahme und -prozessierung mit nachfolgender antitumoralen Immunantwort war (Apetoh *et al.* 2007). In dieser Studie war HMGB1 essentiell für eine effektive antitumorale Immunantwort. Interessanterweise zeigten auch

---

<sup>5</sup> Im Artikel als „DTC-M“ bezeichnet (*damaged tumor cells mixture*)

TLR4-*knock-out*-Mäuse erhöhte Inzidenz und verstärktes Wachstum von orthotopen KHT-Tumoren (Vahle *et al.* 2012). Als Resümee lässt sich zusammenfassen, dass TLR4-Aktivierung auf Tumorzellen protumoral wirkt, auf Zellen des angeborenen Immunsystems jedoch antitumoral. Der zuletzt genannte Effekt scheint im Organismus zu überwiegen. Doch welche Rolle spielt HMGB1 im übrigen tumoralen Geschehen? Ein weiterer Rezeptor für HMGB1 ist RAGE.

#### 5.2.4 RAGE und HMGB1: pro- oder antitumoral?

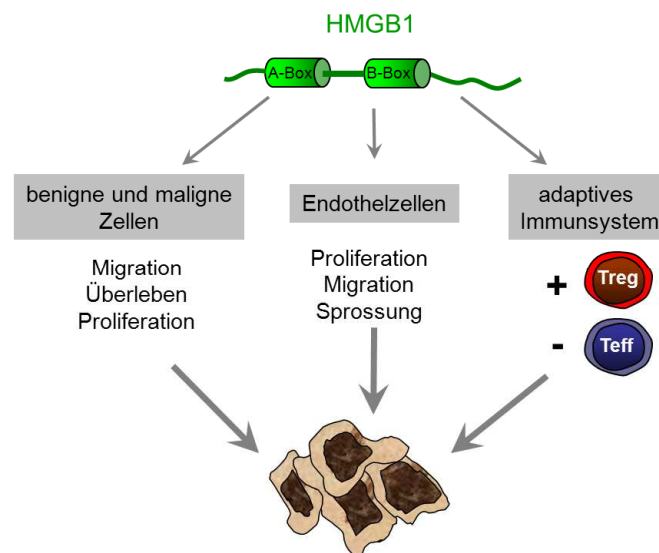
Sowohl die Blockierung von HMGB1 als auch von RAGE konnte in einem murinen Lungenkarzinommodell das Tumorwachstum sowie die Metastasierung hemmen (Taguchi *et al.* 2000). Hier schließt sich wieder die Frage an: welche Zellen zeichnen für die beobachteten Effekte verantwortlich? Mehrere Publikationen, inklusive der hier vorgelegten Arbeit, lassen auf einen direkten aktivitätssteigernden Effekt auf Tregs über eine HMGB1-RAGE Interaktion schließen. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten, konnte Liu *et al.* zeigen, dass tumorales HMGB1 die IL-10-Ausschüttung von Tregs förderte und die Aktivität antitumoraler CD8<sup>+</sup> T-Zellen hemmte (Liu *et al.* 2011). Huang und Kollegen beobachteten bei thermisch geschädigten Ratten einen Anstieg der HMGB1-Serumkonzentrationen bei gleichzeitig erhöhter Expression von FoxP3, CTLA4 und IL-10 in Tregs (Huang *et al.* 2009a). RAGE-neutralisierende Antikörper hoben diese Effekte auf. Gleichzeitig steht RAGE für die Aufrechterhaltung eines chronischen Entzündungsprozesses in der Tumorumgebung, was das Tumorwachstum begünstigt (Rojas *et al.* 2010). RAGE-Expression im Tumorgewebe ist stark mit der Malignität in Magen- (Kuniyasu *et al.* 2002), Kolon- (Kuniyasu *et al.* 2003)<sup>6</sup>, Gallengangs- (Hirata *et al.* 2003), Pankreas- (Takada *et al.* 2004), Prostata- (Ishiguro *et al.* 2005) und Kopf-/Halskarzinomen (Bhawal *et al.* 2005) assoziiert. Auch zeigen Mausmodelle, in denen die Expression von RAGE verhindert oder blockiert wird, ein reduziertes Tumorwachstum (DiNorcia *et al.* 2010; Elangovan *et al.* 2012). Gleichzeitig wurde für HMGB1 im Kolon- (Kuniyasu *et al.* 2003) und Prostatakarzinom (Ishiguro *et al.* 2005) eine Korrelation mit Tumorprogression gezeigt. Wu und Kollegen zeigten, dass HMGB1-Expression mit Tumorprogression und schlechter Überlebensprognose in KHT assoziiert war (Wu *et al.* 2008). HMGB1 wurde in nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und KHT als prognostischer Marker vorgeschlagen (Liu *et al.* 2010; Shang *et al.* 2009). Liu und Kollegen konnten zeigen, dass sowohl in KHT-Zelllinien, als auch in

---

<sup>6</sup> Die Autoren verwenden „Amphoterin“ für HMGB1

*situ* in 91 von 103 KHT-Geweben erhöhte HMGB1-Konzentrationen vorlagen. Diese waren signifikant mit T-Stadium, klinischem Stadium, Rezidiv und Lymphknotenmetastasierung assoziiert (Liu *et al.* 2010). In dieser Arbeit konnten in einer weitaus geringeren Probenanzahl ebenfalls erhöhte HMGB1-Mengen im Tumorgewebe und Patientenserum detektiert werden, ohne eine Korrelation mit klinischen Parametern zu identifizieren.

Eine schlechte Prognose bei hohen HMGB1-Spiegeln scheint den von Apetoh *et al.* beobachteten Effekt, dass HMGB1 für DC-vermittelte Immunüberwachung und *clearance* des Tumors verantwortlich ist, zu widersprechen (Apetoh *et al.* 2007). Auch induziert RAGE-Ligation auf iDC die durchaus gewollte Migration und Reifung, während reife DCs weniger RAGE exprimieren und daher auch weniger stark gegen HMGB1 migrieren (Yang *et al.* 2007). Dies kann auch erklären, warum in der vorliegenden Arbeit Tregs gegen HMGB1 wanderten, während Teffs, mit einer schwächeren RAGE-Expression keine Migration zeigten. Doch die HMGB1/TLR4/RAGE-Interaktion ist so komplex, dass die Umstände sowie Konzentrationen für das eine oder andere Resultat verantwortlich zu sein scheinen. So konnten z.B. Sundberg *et al.* einen proliferationsfördernden Effekt von HMGB1 auf T-Zellen, die mit suboptimalen Mengen  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 aktiviert wurden, beobachten (Sundberg *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde eine Proliferationshemmung bei optimaler TCR-Stimulation gemessen.



**Abb. 5.1 Tumorfördernde Eigenschaften von HMGB1.** Die vorliegende Studie zeigt, dass HMGB1 direkt die Funktionen von Tregs fördert, während gleichzeitig die von Teffs gehemmt werden. Somit wird ein weiterer Arm aufgezeigt, mit Hilfe dessen HMGB1 zum Tumor-Immun-Escape beiträgt.

Aufgrund der Menge an Beweisen der protumoralen Eigenschaften von HMGB1 (s.a. Kapitel 1.4.5 und Abb. 5.1) gibt es erste Ansätze, das Wissen darüber therapeutisch zu nutzen. Ethylpyruvat (EP) ist ein potenter Hemmer der HMGB1-Ausschüttung (Ulloa *et al.* 2002). Dies geschieht vermutlich durch einen *Switch* von nekrotischem zu apoptotischem Zelltod (Lim *et al.* 2007). Sowohl präventive als auch therapeutische Gabe von EP suppressierte in Mausstudien das Wachstum von Leberkarzinomen (Liang *et al.* 2009). EP-behandelte Tumore zeigten weniger Immuninfiltrat gemessen an Monozyten, NK-, T- und B-Zellen. Außerdem waren die IL-6- und HMGB1-Serumlevel in der Therapiegruppe reduziert. Tumorzellen zeigten verstärkte Apoptose (Liang *et al.* 2009). Murine Magenadenokarzinomzellen zeigten nach EP-Behandlung reduzierte HMGB1-, RAGE-, Akt-, p-Akt-, Ki-67- und MMP9-Expression und gleichzeitig erhöhte p53-Expression (Zhang *et al.* 2012). *In vivo* reduzierte EP ebenfalls das Tumorwachstum in diesem Mausmodell.

Es gibt also unterschiedliche Hinweise, ob eine HMGB1-Ausschüttung verhindert oder angestrebt werden sollte. Kroemer und Zitvogel definieren immunogenen Zelltod mit der prä-apoptotischen Exposition von Calreticulin zusammen mit der postapoptotischen Ausschüttung von HMGB1 (Tesniere *et al.* 2008; Tesniere *et al.* 2010). Die Gruppe besitzt mehrere Hinweise für diese Annahme: Bestrahlungs- sowie Chemotherapie mit Oxaliplatin<sup>7</sup> und Anthracyclinen<sup>8</sup> wie Doxorubicin, die genau diese beiden Eigenschaften erfüllen, zeigen eine bessere Immunantwort und reduziertes Tumorwachstum bis hin zu Tumor *clearance* (Apetoh *et al.* 2007; Tesniere *et al.* 2010). Diese Eigenschaften zu erfüllen sollte daher bei der Chemotherapie angestrebt werden, um eine optimale Immunantwort zu gewährleisten, die dann zur endgültigen Tumorbeseitigung führt (Zitvogel *et al.* 2008). Chemotherapeutika und Bestrahlung stellen somit das Hilfswerkzeug des Immunsystems dar. Vor diesem Hintergrund sollte die Gabe von z.B. Glucocorticoiden gegen therapieinduzierte Übelkeit neu überdacht werden, da Glucocorticoide bekannterweise das Immunsystem hemmen (Zitvogel *et al.* 2008).

Bisher wurde nur die Rolle von extrazellulär vorliegendem HMGB1 diskutiert. Doch welche Funktion besitzt es in Tumorzellen? Die lebensnotwendige Bedeutung von HMGB1 zeigt die Tatsache, dass HMGB1-knock-out-Mäuse innerhalb von 24 Stunden nach Geburt sterben

---

<sup>7</sup> Ein Platinderivat aus 5-Fluorouracil und Folinsäure, das zu DNA-Quervernetzung führt

<sup>8</sup> Aus Streptomyces-Arten isolierte Antibiotika, die als Zytostatika zum Einsatz kommen. Binden die Topoisomerase II, ein Schlüsselenzym der Zellteilung.

(Calogero *et al.* 1999). HMGB1 wird als „Architekturprotein“ für Chromatin bezeichnet, da es DNA-Krümmung induzieren und an DNA-Schäden binden kann (Reeves 2010). Überexpression von HMGB1 kann in vielen, wenn nicht sogar allen Tumorzellen beobachtet werden (Lotze and Tracey 2005; Tang *et al.* 2010b). Auch die vorliegende Arbeit konnte diese Tatsache in humanen KHT-Geweben nachweisen. Die HMGB1-Konzentration in Tumorzellen übertraf die Expression in Stromazellen deutlich. Im Mausmodell konnte außerdem eine verstärkte nukleäre Expression von HMGB1 nach PRR-Behandlung beobachtet werden. Hierbei war der Effekt von Imiquimod dem von Poly(I:C) überlegen. Ebenso hatte Imiquimod eine stärkere HMGB1-Freisetzung *in vitro* bewirkt. Auf den histologischen Schnitten war die cytoplasmatische Expression in den PRR-Gruppen niedriger als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist im ersten Moment überraschend und lässt auf eine komplex regulierte HMGB1-Translokation bzw. -Neusynthese schließen. Acetylierung und Phosphorylierung von HMGB1 induziert Translokation vom Zellkern zum Cytoplasma und anschließende Ausschüttung bei Makrophagen und Kolonkarzinomzellen (Bonaldi *et al.* 2003; Kang *et al.* 2009). Posttranslationale Methylierung in Neutrophilen dient als cytoplasmatisches Lokalisationssignal für HMGB1 (Ito *et al.* 2007). Im Zellkern vorliegend fördert HMGB1 Transkription, Replikation, V(D)J-Rekombination, DNA-Reparatur und andere Kernaktivitäten u.a. durch Rekrutierung von Chromatinumformungskomplexen (Lotze and Tracey 2005; Reeves 2010; Tang *et al.* 2010b). HMGB1 wird eine gewisse Schutzfunktion gegenüber Zellstress zugeschrieben. So dient HMGB1 als Link zwischen p53- und Cisplatin-induzierten DNA-Schäden (Imamura *et al.* 2001). Außerdem fördert HMGB1 die Aktivität der humanen Topoisomerase II $\alpha$ , welche ubiquitär vorkommend essentiell für die Proliferation von eukaryotischen Zellen ist (Stros *et al.* 2007). Überexpression von HMGB1 erhöht auch die Expression der Topoisomerase (Stros *et al.* 2009). Ihre Bedeutung für das Tumorstadium verdeutlicht die erfolgreiche Anwendung von Topoisomerasehemmstoffen in der Krebstherapie (Chikamori *et al.* 2010). HMGB1 interagiert mit dem NF $\kappa$ B-Signalweg (Agresti *et al.* 2003). So konnte gezeigt werden, dass HMGB1 die Aktivität von NF $\kappa$ B erhöhte, was gleichzeitig zu einer Überexpression des antiapoptotischen NF $\kappa$ B-Zielproteins c-IAP2<sup>9</sup> in Kolonkarzinomzellen führte (Volp *et al.* 2006). Außerdem war HMGB1 für die NF $\kappa$ B-abhängige Expression von VCAM-1 notwendig (Agresti *et al.* 2003). VCAM-1-Expression auf Tumoren stellte einen effektiven Mechanismus für Tumor-Immun-Escape dar (Lin *et al.* 2007). HMGB1 fördert konzentrationsabhängig die Bindung des Östrogenrezeptors

---

<sup>9</sup> Cellular Inhibitor of Apoptosis-1

an sein *estrogen response element*, was bei der Entstehung des Mammakarzinoms eine Rolle spielen könnte (Verrier *et al.* 1997).

Dennoch besitzt HMGB1 aufgrund seiner Interaktion mit p53, p73 und Retinoblastom durchaus auch tumorsupprimierende Eigenschaften (Tang *et al.* 2010b). Ist HMGB1-Überexpression ein früher Prozess, der für die Tumorgenese notwendig ist, oder tritt HMGB1-Überexpression zu einem späteren Zeitpunkt der Transformation auf? Hierzu gibt es keine Untersuchungen. HMGA-Proteine hingegen, nahe Verwandte der HMGB-Proteine, sind diesbezüglich genauer untersucht. So konnte gezeigt werden, dass HMGA-Überexpression in Zellen, die die Seneszenzgrenze bereits überschritten hatten, antiapoptotische statt proapoptotische Signalwege anschalteten (Reeves 2010). Außerdem ist das HMGA<sup>10</sup>-Gen eine Zielstruktur des Onkoproteins c-Myc, welches folglich die Expression des Proteins fördert (Wood *et al.* 2000). Die Fibroblastenzelllinie Rat 1a, in denen HMGA ektopisch überexprimiert wurde konnte *in vitro* transformieren und in einem Softagar-Assay Kolonien bilden. Dieser Effekt war nicht zu beobachten, wenn die Fähigkeit von HMGA an DNA zu binden durch Mutation unterbunden worden war (Wood *et al.* 2000). Dies ging mit erhöhtem Anteil der Zellen in der S-Phase einher. Zusätzlich konnte die Gruppe zeigen, dass Überexpression von HMGA zur Ausbildung von Fibrosarkomen in Nacktmäusen führte. Vektor-transfizierte Zellen bildeten hingegen keine Tumore. Überexpression von HMGA kann folglich zur Transformation von Zellen beitragen, aber ob dies auch für Mitglieder der HMGB-Familie zutrifft, muss noch untersucht werden.

Tatsache ist, dass die verschiedenen Abschnitte von HMGB1 unterschiedliche Funktionen besitzen. So ist der saure C-terminale Schwanz für die Interaktion mit Nukleinsäuren notwendig (Wang *et al.* 2007). Die A-Box wird für die Wechselwirkung mit p53 benötigt, A- und B-Box für Interaktion mit p73 (Tang *et al.* 2010b). Die B-Box vermittelt die proinflammatorischen Eigenschaften von HMGB1 (Li *et al.* 2003). Die alleinstehende A-Box dient als spezifischer Inhibitor der B-Box und wirkt antiinflammatorisch (Yang *et al.* 2004). Die RAGE-Bindungsstelle von HMGB1 ist am C-terminalen Ende der B-Box lokalisiert (Huttunen *et al.* 2002)<sup>11</sup>. Die B-Box ist für die Aktivierung von Endothelzellen über RAGE verantwortlich (Treutiger *et al.* 2003). Welcher Abschnitt von HMGB1 Tregs aktiviert ist nicht bekannt. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um mögliche Inhibitoren gezielt einzusetzen.

---

<sup>10</sup> Im Artikel mit dem alten Namen HMG-I/Y bezeichnet

<sup>11</sup> Die Autoren verwenden den mittlerweile nicht mehr gebräuchlichen Begriff „Amphoterin“ für HMGB1



### 5.2.5 Welche Rolle spielt das Stroma?

Das Tumormikromilieu solider Tumore besteht nicht nur aus Tumor- und Immunzellen, sondern auch aus Stromazellen wie Endothelzellen, mesenchymalen Stammzellen und Fibroblasten. Deren Beteiligung an Tumorentstehung und -progression darf nicht unterschätzt werden (Hanahan and Weinberg 2011). Da sie ebenfalls mit PRRs ausgestattet sind, muss ihre Aktivierung durch endogene DAMPs oder synthetische/exogene PRR-Adjuvanzien ebenfalls untersucht werden.

HMGB1 förderte durch RAGE-Ligation auf Endothelzellen Neovaskularisierung *in vitro* und *in vivo* (Mitola *et al.* 2006). Dies könnte die hier beobachtete gesteigerte Proliferation von HMEC-Zellen in HMGB1-reichem Imiquimod-FaDu/Monozyten-Überstand erklären. Gleichzeitig trägt HMGB1-RAGE-Interaktion zum Tumorwachstum bei gleichzeitig ablaufendem nekrotischem Zelltod bei.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen aus der Nasenschleimhaut auf LPS reagierten und nachfolgend die Funktion neutrophiler Granulozyten modulierten (Brandau *et al.* 2010; Jakob *et al.* 2010). Dies verbindet wieder bakterielle Entzündung mit chronischer Entzündung und Tumorentstehung.

Doch es gibt auch Fälle, in denen Stromazellen indirekt antitumoral wirken: Wang *et al.* zeigten in ihrer Mausstudie, dass nach Poly(I:C)-Behandlung MDA5-Expression im Stroma ausschlaggebend für die Entstehung von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen war (Wang *et al.* 2010). Diese Beispiele verdeutlichen das komplexe Zusammenspiel aus Immun-, Tumor- und Stromazellen. Ob PRR-Aktivierung gut oder schlecht ist, lässt sich nicht pauschalisieren. Genauso wenig lassen sich Effekte von DAMPs oder PAMPs verallgemeinern.

Gerade weil diverse PRR-Adjuvanzien so viele Zielstrukturen besitzen, stellt dies eine große Herausforderung für die Wirkstoffverpackung und den -transport dar (s.a. Kapitel 5.2.7).

### 5.2.6 Einsatz von Imiquimod als Krebstherapeutikum und Adjuvans

Imiquimod besitzt bereits seit 1998 als 5%-ige Creme Aldara® eine Zulassung<sup>12</sup>. Indikationsgebiete sind äußerliche Feigwarzen im Genitalbereich, nicht hyperkeratotische aktinische Keratosen sowie das kleine superfizielle Basalzellkarzinom (Wagstaff and Perry 2007). Bei der topischen Anwendung gegen Basalzellkarzinom konnte z.B. eine Tumor *clearance* von 79% bis 82% erreicht werden (Geisse *et al.* 2004). Generell fokussiert sich die

---

<sup>12</sup> Fachinfo, Meda Pharma GmbH & Co. KG

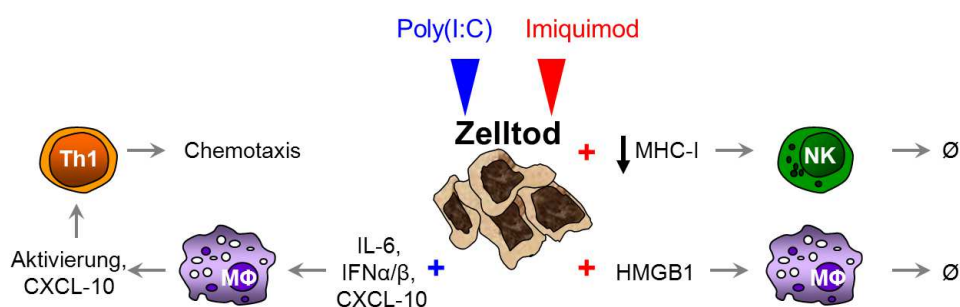
Forschung über Imiquimod auf topische Anwendungen: bei Patienten mit metastasierendem Melanom mit subkutanen Läsionen konnte ein Rückgang der Läsionen sowie ein verlangsamtes Auftreten neuer Läsionen durch eine Kombinationstherapie aus 5% Imiquimod-Creme und IL-2, das direkt in die Läsionen injiziert wurde, festgestellt werden (Green *et al.* 2007). Topische Anwendung von Imiquimod erhöht die Anzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Haut und von CD4<sup>+</sup> Zellen im angrenzenden Lymphknoten (Narayan *et al.* 2012). Präkanzerogene Läsionen der Mundschleimhaut bei Ratten konnten erfolgreich mit Imiquimod behandelt werden (Gkoulioni *et al.* 2010). Erste Erfolge beim oralen Melanom der Mundschleimhaut wurden ebenfalls beobachtet (Smyth *et al.* 2011). Es gibt auch einzelne Fallberichte, in denen Melanommetastasen in Leber und Galle nach topischer Anwendung von Imiquimod 5% zurück gingen (Miller *et al.* 2011).

Humane Studien zur innerlichen Anwendung sind rar, murine Studien zur systemischen Anwendung hingegen sind verfügbar. Im Mausmodell konnte nach venöser Applikation einer Nierenkarzinomzelllinie oral verabreichtes Imiquimod-Derivat 3M-011 die Inzidenz von Lungenmetastasen verringern und gleichzeitig Zelltod induzieren (Schwartz *et al.* 2009). Das Wachstum subkutan injizierter Kolonkarzinomzellen konnte durch orale Gabe von Imiquimod gehemmt werden (Sidky *et al.* 1992). Der Effekt war IFN $\alpha$ -abhängig. Beim Menschen wurden bereits in den 90er Jahren erste Tests dahingehend durchgeführt: verschiedene orale Applikationsschemata von ein- bis zweimal wöchentlich 100-500 mg Imiquimod wurden in zwei Phase I Studien untersucht. Es konnten erhöhte IFN $\alpha$ -Mengen im Blut sowie weitere PBMC-Aktivierungsmarker ( $\beta$ -2-Mikroglobulin, Neopterin) festgestellt werden, jedoch ohne ein klinisches Ansprechen der Patienten zu beobachten (Savage *et al.* 1996; Witt *et al.* 1993). Hierbei gilt zu beachten, dass es sich um 16 bzw. 21 Patienten mit austherapierten metastasierten Karzinomen handelte. Bei einer Dosis von 100 mg Imiquimod konnte lediglich eine orale Bioverfügbarkeit von 47% erreicht werden (Soria *et al.* 2000). Zusätzlich ist die Eliminationshalbwertszeit von nur 2,5 Stunden sehr gering (Soria *et al.* 2000). Überlegungen zu alternativen Formulierungen und Applikationsschemata sind notwendig (Hayashi *et al.* 2010). Mittlerweile sind neue Imidazoquinolin-Derivate wie 8A52 auf dem Markt, die sich mit einer höheren Affinität gegenüber TLR7 und einer langsameren Eliminationshalbwertszeit auszeichnen (Gorden *et al.* 2005; Harrison *et al.* 2007). Oral verabreicht erreicht 8A52 zwar nur eine Bioverfügbarkeit von 26%; i.v. und subkutan jedoch 80.5% bzw. 95% (Harrison *et al.* 2007). In ersten PhaseI/II-Studien wurde dieser TLR7-Ligand i.v. bei Patienten mit soliden Tumoren appliziert. Zwar konnte vereinzelt ein Ansprechen auf die

Therapie beobachtet werden, doch war die Erfolgsquote insgesamt gesehen gering (Dudek *et al.* 2007;Dummer *et al.* 2008).

Wie ist der mangelnde Erfolg der TLR-basierten Tumorthherapie zu erklären? Dieses Beispiel zeigt erneut die Diskrepanz zwischen humanen und murinen Studien. In Mausstudien konnte die Therapie mit Imiquimod und Imiquimod-Analoga in vielen Modellen Tumorwachstum hemmen (Broomfield *et al.* 2009;Currie *et al.* 2008;Liu *et al.* 2008a). Jedoch wurde hierbei Imiquimod häufig direkt intra-tumoral injiziert. Dieses Vorgehen ist beim Menschen i.R. nicht durchführbar. Broomfield und Kollegen konnten zeigen, dass die intratumorale Applikation von Imiquimod das Tumorwachstum in Abhängigkeit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen, sowie Typ I und II IFN hemmte. Trotz systemischer CD8-Aktivierung konnte keine Tumorregression distaler Tumore beobachtet werden. Der limitierende Faktor für ein systemisches Ansprechen der Therapie schien eine mangelhafte CD4-Aktivierung zu sein, die durch zusätzliche Gabe von anti-CD40 aufgehoben werden konnte (Broomfield *et al.* 2009).

Als weitere mögliche Ursache wird in der Fachwelt das für TLR4 entdeckte Phänomen der TLR-Toleranz diskutiert, bei dem wiederholte LPS-Stimulation zu einer verminderten Reaktion führte (Greisman *et al.* 1975). Dieser Effekt ist mittlerweile auch für TLR2, TLR5 und TLR7 nachgewiesen (Broad *et al.* 2007;Geisel *et al.* 2007;Hayashi *et al.* 2009;Tsukada *et al.* 2007). Neue zyklische Therapieschemata, die therapiefreie Perioden beinhalten, zeigen im Mausversuch vielversprechende Resultate (Bourquin *et al.* 2011). Die vorliegende Arbeit zeigt eine weitere Möglichkeit auf, die den Erfolg einer Therapie mit TLR7-Liganden limitieren könnte: nicht-immunogener Zelltod (siehe Abbildung 5.2).



**Abb. 5.2 Unterschiedliche Immunaktivierung durch Poly(I:C)- und Imiquimod-induzierten Tumorzelltod.** Imiquimod-Behandlung von Tumorzellen führt weder zur Ausschüttung von Zytokinen noch zur Immunaktivierung. Poly(I:C)-behandelte Tumorzellen aktivieren Monozyten, was nachfolgend Th1-Rekrutierung induziert.

### 5.2.7 Einsatz von Poly(I:C) als Krebstherapeutikum und Adjuvans

Im Gegensatz zu den für Imiquimod gezeigten Daten konnte Poly(I:C) in der vorliegenden Arbeit eine Art immunogenen Zelltod induzieren, was zu einer Aktivierung und Reifung von Monozyten, Sekretion antitumoraler Zytokine (Typ I IFN, CXCL-10) und Th1-Rekrutierung führte.

Auch Kübler und Kollegen konnten nach cytosolischer Gabe von Poly(I:C) in Ovarialkarzinomzelllinien Zytokinausschüttung, Apoptose und nachfolgende Reifung von Monozyten und DCs beobachten. Der Überstand der myeloiden Zellen führte anschließend zu einer Aktivierung von NK-Zellen (Kubler *et al.* 2011). Im gleichen Jahr veröffentlichten Kovalcsik und Kollegen, dass durch Poly(I:C) getötete Tumorzellen verstärkt die Reifung von DCs hervorriefen, welche dann eine Th1-Antwort sowie antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten (Kovalcsik *et al.* 2011). Mittels Bestrahlung getötete Zellen zeigten keine oder eine geringere Wirkung in den gemessenen *read outs*. Dies beweist erneut, dass die Art des Tumorzelltods ausschlaggebend für die Immunantwort ist und dass Poly(I:C) ein interessanter Kandidat für die *in vivo* Applikation bzw. *ex vivo* hergestellte DC-Vakzinierung darstellt. Hierfür müssen einige Standpunkte diskutiert werden. 1. Wie gut ist die DC-Vakzinierung durchführbar und anzuwenden? 2. Wie verträglich ist Poly(I:C) *in vivo*? 3. Wie kann Poly(I:C) direkt in die Tumorzelle *in vivo* geliefert werden?

Die klassische Anwendung von TLR-Liganden in der Krebstherapie bezieht sich auf ihre immunstimulatorische Eigenschaft. Man erhofft sich durch Adjuvanzen die Toleranz bzw. Suppression des Immunsystems gegenüber Tumorantigenen zu überwinden. In Tierversuchen konnte dies bereits eindrucksvoll gezeigt werden. Salem *et al.* zeigten 2005 in einem antigen-spezifischen Mausmodell, dass Peptidvakzinierung und Poly(I:C)-Behandlung deutlich eine primäre und CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellantwort verstärkte, was anhand erhöhter Zellzahl und Zytokinproduktion (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) nachgewiesen wurde (Salem *et al.* 2005). Die gesteigerte Zellzahl konnte auf eine verstärkte Expression von Bcl-3 und Bcl-xL sowie verminderter Apoptose zurückgeführt werden. Murine T-Zellen sprechen auch direkt auf Poly(I:C) an. Gelman *et al.* fanden, dass Poly(I:C) direkt durch Hochregulierung der Bcl-xL-Expression das Überleben muriner CD4<sup>+</sup> T-Zellen förderte jedoch ohne Proliferation zu induzieren (Gelman *et al.* 2004). Murine CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die *ex vivo* mit Poly(I:C) behandelt wurden, zeigten Aktivierungsmerkmale und eine erhöhte Expansionsrate nach adoptivem Transfer in Empfängermause und Antigenstimulation (Salem *et al.* 2009). Humane T-Zellen hingegen zeigten kaum Reaktion auf Poly(I:C), wie einleitend erwähnt wurde (s.a. Kapitel 1.4.4).

Dennoch sind die Ergebnisse der Mausstudien vielversprechend. Poly(I:C) zeigte nicht nur bei einem immunogenen Peptid starke Adjuvanzwirkung, sondern konnte auch bei einem nicht-immunogenen, wirteigenen, tumorassoziierten Peptid die CTL-Antwort fördern (Salem *et al.* 2005). Außerdem konnte die adjuvante Therapie mit Poly(I:C) die Tumorlast im Lymphom- und Melanommausmodell bei gleichzeitig gesteigerter CD8-Aktivität senken. Poly(I:C)-Behandlung erhöhte die Serumkonzentration von IL-6, IL-10, MCP-1, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , and IFN $\gamma$  (Salem *et al.* 2006). Interessanterweise waren die für CD8-T-Zellen beobachteten Effekte NK-zellabhängig.

Mittlerweile gibt es sogar erste Studien, welche dieses Prinzip auf den Menschen zu übertragen versuchen. Morse und Kollegen verwendeten in ihrer Phase I-Studie das Vakzin CDX-1307 (Morse *et al.* 2011). Hierfür wurde ein Mannose-Rezeptor-spezifischer Antikörper mit der  $\beta$ -Kette des humanen Choriongonadotropins (HCG)<sup>13</sup> fusioniert. Der Mannose-Rezeptor wird typischerweise auf phagozytierenden Zellen exprimiert und dient dem gezielten Transport des TAA an die DC (Morse *et al.* 2011). HCG ist ein schwach immunogenes TAA. Mithilfe der gleichzeitigen subkutanen oder intravenösen Applikation von Poly(I:C) oder Resiquimod (jeweils zusammen mit GM-CSF) konnte eine effektive Immunantwort bei Patienten mit epithelialen Karzinomen erzielt werden. Diese fiel bei intradermaler Gabe beider TLR-Agonisten am stärksten und langfristigen aus. Nebenwirkungen waren gering (Morse *et al.* 2011). Okada und Kollegen verwendeten in ihrer Studie autologe, Monozyten-generierte und besonders aktivierte DCs ( $\alpha$ DC1), deren Vorteile hohe IL-12-Sekretion und Induktion langlebiger Th1-Antwort sind (Okada *et al.* 2011). Diese wurden, mit Glioma-assoziierten Antigen- (GAA) Peptiden beladen, in die Lymphknoten appliziert. Poly(I:C) wurde zweimal wöchentlich intramuskulär gegeben. Eine spezifische Immunantwort gegen mindesten ein TAA konnte in 58% der Patienten nachgewiesen werden. Erhöhte Level an Zytokinen u.a. IFN $\alpha$  und CXCL-10 wurden gemessen. Die Behandlung wurde gut vertragen. Ein Patient mit Rezidiv zeigte volles Ansprechen 17 Wochen nach Vakzinierung, welches mindesten 13 Monate nach Therapiestart andauerte (Okada *et al.* 2011). Diese ersten Ergebnisse sind vielversprechend und zeigen die Komplexität einer möglicherweise zukunftsweisenden Krebstherapie auf.

Die Alternative ist, Poly(I:C) allein zu applizieren und sich seine immunstimulierenden, aber auch tumortötenden Eigenschaften zu nutze zu machen. Poly(I:C) direkt als Krebs-

---

<sup>13</sup> Im Blut von Schwangeren erhöht. Bei Nichtschwangeren findet HCG Anwendung als Tumormarker

therapeutikum zu verwenden ist verlockend, da es in immunkompetenten (Currie *et al.* 2008) als auch immundefizienten (Besch *et al.* 2009) murinen Tumormodellen eine Regression von etablierten Tumoren bewirken konnte. Gemeinsam mit dem Immunsystem vermochte Poly(I:C)-Administration in 40% der behandelten Mäuse eine vollständige Tumorregression zu bewirken (Currie *et al.* 2008). Doch bis zu welcher Dosis ist Poly(I:C) für den Menschen verträglich? Bereits 1969 analysierte man die systemische Applikation von Poly(I:C) beim Menschen und hielt sie aufgrund endotoxin-ähnlicher *cytokine storms* für zu toxisch (Absher and Stinebring 1969). In den 80er Jahren unternahm man erneut Versuche mit alternativen Formulierungen und Applikationsintervallen die Toxizität in den Griff zu bekommen. In den meisten der 32 behandelten Patienten wurden erhöhte IFN $\alpha$ -Serumspiegel detektiert (Krown *et al.* 1985). Neben Fieber, Rigor und Hypotonie entwickelten zwei Patienten systemische allergische Reaktionen. Ein Patient mit Nierenzellkarzinom zeigte dafür eine teilweise Tumorregression (Krown *et al.* 1985). In einer anderen Studie sprach kein Patient auf die Behandlung an, wobei die Nebenwirkungen zum größten Teil gering waren (Stevenson *et al.* 1985). In einer kürzlich veröffentlichte Studie wurde Poly(I:C) subkutan bei gesunden Menschen appliziert. Die Autoren konnten in PBMCs auf transkriptioneller Ebene die Aktivierung von IFN- und Inflammasom-Signalwegen feststellen (Caskey *et al.* 2011).

Zielt die Poly(I:C)-Therapie auf das immunogene Abtöten von Tumorzellen ab (Kovalcsik *et al.* 2011;Kubler *et al.* 2011)(vorliegende Arbeit), sollten jedoch speziellere *drug delivery* Systeme in Erwägung gezogen werden. Hierfür bieten sich nanostrukturierte Trägersysteme an (Wagner 2007). Das in der vorliegenden Arbeit skizzierte Therapieschema trifft *in vivo* auf zwei zu überwindende Herausforderungen: 1. Zunächst muss verhindert werden, dass die Nanopartikel von phagozytierenden Zellen eliminiert werden. Mit Hilfe spezieller hydrophiler Oberflächenstrukturen, z.B. Polyethylenglycol (PEG) kann man diese Wechselwirkungen minimieren (Ambegia *et al.* 2005). 2. Poly(I:C) muss direkt in die Tumorzelle geliefert werden. Die speziellen Nanopartikel können, ohne phagozytiert zu werden, länger im Blutkreislauf zirkulieren. Damit erhöht sich auch die Chance in das maligne Gewebe zu gelangen (Wagner 2007). Hierbei hilft der EPR-Effekt des Tumorgewebes (Fang *et al.* 2011). Die Abkürzung steht für erhöhte Permeabilität und Retention. Die Tumorblutgefäße weisen aufgrund ihrer speziellen pathophysiologischen Entstehung eine besondere Beschaffenheit auf. Makromoleküle können das lockere Endothel passieren und werden gleichzeitig verstärkt im Tumorgewebe zurück gehalten (Fang *et al.* 2011). Organische kationische Lipide oder Polymere bilden zusammen mit therapeutischen Nukleinsäuren/-analoga virusähnliche sog. Lipoplexe bzw. Polyplexe (Wagner 2007). Biologische Trigger, wie z.B. der pH-Wert führen dann zum Freilassen der Nukleinsäuren. Abraxane®, eine Paclitaxel-Zubereitung,

erhielt 2005 als erstes Nanopartikel-Produkt die Zulassung. Poly(I:C), komplexiert in kationischen Polymere, wird bereits in Mausstudien erfolgreich zur Reduktion von Tumoren eingesetzt (Besch *et al.* 2009;Tormo *et al.* 2009). Laut Hersteller<sup>14</sup> wird die Technologie auch in ersten Phase I/II Studien angewendet.

Die vorliegende Arbeit deckt neue immunologische Tumor-Wirt-Interaktionen auf, die durch therapeutische und endogene PRR-Liganden moduliert werden. Diese komplexe Wechselwirkung sollte bei der Entwicklung zukünftiger PRR-basierter Therapeutika berücksichtigt werden.

---

<sup>14</sup> „in vivo jet-PEI“ von pequlab

## 6 Zusammenfassung/ Summary

Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) sind eine evolutionär gesehen hoch konservierte Rezeptorfamilie, die für die Erkennung exogener pathogen-assoziiierter (PAMPs) und endogener (DAMPs) Gefahrenmoleküle zuständig ist. Nach ihrer Entdeckung nahm man lange Zeit an, dass sie nur von Immunzellen, v.a. des angeborenen Immunsystems, exprimiert werden. Liganden dieser PRRs wurden sogar bereits vor der Entdeckung der Rezeptoren für therapeutische Zwecke erforscht und eingesetzt, wenn eine Steigerung der immunologischen Abwehr z.B. gegen Krebs gewünscht war. Synthetische Liganden, die PAMPs ähneln, sind interessante Kandidaten für die Krebsimmuntherapie. Seit Kurzem weiß man, dass auch Tumorzellen PRRs tragen, deren Aktivierung mittels therapeutischer Liganden Tumorzelltod induzieren kann. Beim Zelltod werden wiederum endogene PRR-Liganden frei gesetzt, die dann auf umliegende Zellen wirken können. Folglich kann es bei der PRR-basierten Krebsimmuntherapie zu einer bisher unbekannten immunologischen Tumor-Wirt-Interaktion kommen. Ziel der Arbeit war es, einige Mechanismen dieser Interaktion zu beleuchten.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt der therapeutischen Liganden Imiquimod und Poly(I:C) auf Kopf-/Halstumorzellen und die Auswirkungen auf Immunzellen untersucht. Beide Therapeutika induzierten in einem ähnlichen Ausmaß Zelltod, wobei Imiquimod konventionell nach Endozytose wirken konnte, Poly(I:C) hingegen durch Elektroporation cytosolisch wirkte. Poly(I:C) förderte die Freisetzung der Zytokine IL-6, Typ I IFN und CXCL-10. Die Kokultur von Poly(I:C)-behandelten Tumorzellen mit Monozyten erhöhte deren Aktivierungsstatus, was in einer verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle und Zytokinausschüttung resultierte. In der Tat förderte der Überstand dieser Kokultur die Migration von Th1-Zellen. Interessanterweise hatte die Behandlung der Tumorzellen mit Imiquimod keinen der beschriebenen Effekte. Obwohl Imiquimod eine Herunterregulation der MHC-I-Expression auf Tumorzellen bedingte, kam es nachfolgend zu keiner gesteigerten NK-Zell-Degranulation. In einem murinen Xenograft-Tumormodell konnte die Induktion von Zelltod sowie die unterschiedliche MHC-I-Regulation bestätigt werden. Poly(I:C)-Behandlung führt demnach zu Tumorzelltod und nachfolgender Immunaktivierung, Imiquimod hingegen induziert eine Art „nicht-immunogenen“ Zelltod.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der direkte Effekt des endogenen Gefahrenmoleküls HMGB1 auf Zellen des adaptiven Immunsystems untersucht. Hierbei standen CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg) als Hauptakteure des Tumor-Immun-*Escape*-Phänomens im



Vordergrund. HMGB1-Expression im Gewebe und Serum von KHT-Patienten war im Vergleich zu gesunden Proben deutlich erhöht. Imiquimod-Behandlung von Tumorzellen führte zu starker Freisetzung dieses Kernproteins. HMGB1 zeigte potentielle protumorale Wirkung indem es die Migration von Tregs, sowie deren IL-10-Sekretion und suppressive Aktivität förderte. Effektor-T-Zellen (Teffs) wurden hingegen nicht chemotaktisch angelockt. Zusätzlich wurden ihre potentiell antitumoralen Eigenschaften wie Proliferation und IFN $\gamma$ -Sekretion durch HMGB1 gehemmt. Tregs und Teffs von Tumorpatienten reagierten trotz erhöhter TLR4-Expression in ähnlichem Ausmaß wie die von gesunden Spendern. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die meisten beobachteten Effekte auf Tregs RAGE-abhängig waren. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HMGB1 bei physiologischem und therapeutika-induziertem Zelltod freigesetzt wird und die T-Zell-Funktion dahingehend moduliert, dass Tumor-Immun-*Escape* favorisiert wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass synthetische und endogene PRR-Liganden kompetente Modulatoren der immunologischen Tumor-Wirt-Interaktion darstellen. Die Ergebnisse decken neue Wirkmechanismen altbekannter Moleküle auf, die den Einsatz von Poly(I:C) als Krebstherapeutikum, sowie die Hemmung von HMGB1/RAGE und somit Unterbindung von Treg-Aktivierung empfehlen. Weitere intensive Forschung ist notwendig, um die komplexe immunologische Tumor-Wirt-Interaktion vollends zu verstehen.

## Summary

The pattern recognition receptors (PRRs) belong to an evolutionary highly conserved receptor family responsible for recognizing pathogen associated molecular pattern molecules (PAMPs) and danger associated molecular pattern molecules (DAMPs). A long period of time it was assumed that they are localized mainly on immune cells notably cells of the innate immune system. Before the PRRs were even discovered their ligands were investigated and implemented for diseases where the enhancement of an immune response was warranted e.g. in cancer. Because of their immunostimulatory potential, synthetic analogues for exogenous PAMPs are being explored as cancer immunotherapeutics. It was recently found that also tumor cells can express PRRs and that their challenge can induce cancer cell death. During cell death endogenous DAMPs are released and can act on surrounding tissue. Thus, PRR-based immunotherapy may lead to a, until now unknown complex tumor-immune cross talk within the tumor microenvironment. Aim of this thesis was to at least partially elucidate this interaction.

In the first part, the effect of head and neck cancer (HNC) cell stimulation by the therapeutic PRR ligands Poly(I:C) and Imiquimod and the consequences for interaction with immune cells was investigated. We found that exogenous delivery of Imiquimod and intracellular delivery of Poly(I:C) using transfection resulted in cell death of tumor cells. In contrast to Imiquimod, Poly(I:C) induced strong release of the cytokines IL-6, Type I IFN and CXCL-10. Interestingly, Poly(I:C) treatment of tumor cells enhanced the activation status of co-cultured monocytes resulting in the upregulation of immune stimulatory surface molecules and cytokine release. This result indicates an immune activation and anti-tumoral effect of Poly(I:C). Indeed, the supernatant of this monocyte/tumor cell co-culture strongly induced chemotaxis of Th1 cells, when tumor cells were pre-treated with Poly(I:C). These effects did not occur when tumor cells were treated with Imiquimod. Even though, Imiquimod induced down-regulation of MHC-class I molecules on the tumor cell surface, this did not result in further activation of NK cells. We could observe the induction of cell death and the differential MHC-class I regulation also in a murine xenograft tumor model using nude mice. In conclusion, we found that both Poly(I:C) and Imiquimod induce cell death in tumor cells. However, while Poly(I:C)-treatment leads to a subsequent immune activation, Imiquimod-treated tumor cells undergo a type of non-immunogenic cell death.

In the second part of the project we asked whether the endogenous danger molecule HMGB1 (high mobility group box 1 protein) can directly modulate T lymphocytes focusing on regulatory T cells (Treg) as the main players in *tumor immune escape* phenomenon. During tumor cell death, endogenous DAMPs can be released, that bind to PRRs on tumor cells themselves or on immune cells. HMGB1 is the most prominent DAMP, binds to TLR2, TLR4 and RAGE on target cells and can be released during necrotic or chemotherapy-induced tumor cell death. Interestingly, we found that HMGB1 is overexpressed in tumor cells of patients with HNC, that serum levels are significantly elevated in these patients compared to healthy donors, and that Imiquimod-induced cell death results in release of HMGB1 by tumor cells. We found that HMGB1 induced directed migration in Treg and not effector T cells (Teff). Additionally, HMGB1 promoted regulatory characteristics of Treg such as suppressive activity and IL-10 release. At the same time HMGB1 reduced anti-tumoral effector functions of Teff like proliferation and IFN $\gamma$  release. Unexpectedly, increased expression of TLR4 on Treg and Teff in HNC patients did not result in enhanced activation of Treg in patients compared to healthy donors. This may be explained by the fact that HMGB1 modulates Treg via RAGE. Our findings demonstrate that HMGB1 can be released from HNC cells during homeostatic or therapy-induced cell death and differentially modulates functions of Treg and Teff in the tumor host favoring *tumor immune escape*.

This project revealed novel effects of therapeutic and endogenous PRR ligands on tumor-immune cross talk in HNC. Poly(I:C), for instances, acts in many different ways anti-tumoral while the HMGB1/RAGE interaction which leads to Treg activation should be prevented. In addition to the pure immunostimulatory potential of PRR ligands, these effects should be considered when designing future immunologic therapy of this tumor entity.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abel, U. Spontanremissionen aus biometrischer Sicht. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*, 2001, 33: 115.
- Abrams, S. I. and Brahmi, Z. The functional loss of human natural killer cell activity induced by K562 is reversible via an interleukin-2-dependent mechanism. *Cell Immunol.*, 1986, 101: 558-570.
- Absher, M. and Stinebring, W. R. Toxic properties of a synthetic double-stranded RNA. Endotoxin-like properties of poly I. poly C, an interferon stimulator. *Nature*, 1969, 223: 715-717.
- Agresti, A., Lupo, R., Bianchi, M. E. and Muller, S. HMGB1 interacts differentially with members of the Rel family of transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 302: 421-426.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, 413: 732-738.
- Algarra, I., Collado, A. and Garrido, F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int. J. Clin. Lab Res.*, 1997, 27: 95-102.
- Alvaro, T., Lejeune, M., Salvado, M. T., Bosch, R., Garcia, J. F., Jaen, J., Banham, A. H., Roncador, G., Montalban, C. and Piris, M. A. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11: 1467-1473.
- Ambach, A., Bonnekoh, B., Nguyen, M., Schon, M. P. and Gollnick, H. Imiquimod, a Toll-like receptor-7 agonist, induces perforin in cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Mol. Immunol.*, 2004, 40: 1307-1314.
- Ambegia, E., Ansell, S., Cullis, P., Heyes, J., Palmer, L. and MacLachlan, I. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1669: 155-163.
- Anderson, K. V., Jurgens, G. and Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*, 1985, 42: 779-789.
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H. and Tracey, K. J. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J. Exp. Med.*, 2000, 192: 565-570.
- Andrade Filho, P. A., Ito, D., DeLeo, A. B. and Ferris, R. L. CD8+ T cell recognition of polymorphic wild-type sequence p53(65-73) peptides in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010, 59: 1561-1568.
- Anz, D., Koelzer, V. H., Moder, S., Thaler, R., Schwerd, T., Lahl, K., Sparwasser, T., Besch, R., Poeck, H., Hornung, V., Hartmann, G., Rothenfusser, S., Bourquin, C. and Endres, S. Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2010, 184: 939-946.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F. J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J. P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., Andre, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G. and Zitvogel, L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.*, 2007, 13: 1050-1059.
- Aptsiauri, N., Cabrera, T., Garcia-Lora, A., Lopez-Nevot, M. A., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F. MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *Int. Rev. Cytol.*, 2007, 256: 139-189.
- Attia, P., Maker, A. V., Haworth, L. R., Rogers-Freezer, L. and Rosenberg, S. A. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J. Immunother.*, 2005, 28: 582-592.
- Aymeric, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Martins, I., Kroemer, G., Smyth, M. J. and Zitvogel, L. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res.*, 2010, 70: 855-858.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay, N. H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W. H., Brasnu, D. F. and Tartour, E. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12: 465-472.
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. and Hafler, D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.*, 2001, 167: 1245-1253.

- Baldwin, S. L., Bertholet, S., Reese, V. A., Ching, L. K., Reed, S. G. and Coler, R. N. The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine. *J. Immunol.*, 2012, 188: 2189-2197.
- Balkwill, F., Charles, K. A. and Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 2005, 7: 211-217.
- Ball, J. K. and McCarter, J. A. Effect of polyinosinic-polycytidylic acid on induction of primary or transplanted tumors by chemical carcinogen or irradiation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1971, 46: 1009-1014.
- Baniyash, M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, 4: 675-687.
- Barbalat, R., Ewald, S. E., Mouchess, M. L. and Barton, G. M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, 29: 185-214.
- Barnetson, R. S., Satchell, A., Zhuang, L., Slade, H. B. and Halliday, G. M. Imiquimod induced regression of clinically diagnosed superficial basal cell carcinoma is associated with early infiltration by CD4 T cells and dendritic cells. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2004, 29: 639-643.
- Barnett, B., Kryczek, I., Cheng, P., Zou, W. and Curiel, T. J. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2005, 54: 369-377.
- Barton, G. M., Kagan, J. C. and Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.*, 2006, 7: 49-56.
- Baselga, J., Trigo, J. M., Bourhis, J., Tortochaux, J., Cortes-Funes, H., Hitt, R., Gascon, P., Amellal, N., Harstrick, A. and Eckardt, A. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.*, 2005, 23: 5568-5577.
- Bassi, R., Giussani, P., Anelli, V., Colleoni, T., Pedrazzi, M., Patrone, M., Viani, P., Sparatore, B., Melloni, E. and Riboni, L. HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration. *J. Neurooncol.*, 2008, 87: 23-33.
- Bell, J. K., Askins, J., Hall, P. R., Davies, D. R. and Segal, D. M. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, 103: 8792-8797.
- Berendt, M. J. and North, R. J. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J. Exp. Med.*, 1980, 151: 69-80.
- Bergmann, C., Bachmann, H. S., Bankfalvi, A., Lotfi, R., Putter, C., Wild, C. A., Schuler, P. J., Greve, J., Hoffmann, T. K., Lang, S., Scherag, A. and Lehnerdt, G. F. Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Transl. Med.*, 2011a, 9: 139.
- Bergmann, C., Wild, C. A., Narwan, M., Lotfi, R., Lang, S. and Brandau, S. Human tumor-induced and naturally occurring Treg cells differentially affect NK cells activated by either IL-2 or target cells. *Eur. J. Immunol.*, 2011b, 41: 3564-3573.
- Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Hacker, G., Berking, C., Hornung, V., Endres, S., Ruzicka, T., Rothenfusser, S. and Hartmann, G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J. Clin. Invest.*, 2009, 119: 2399-2411.
- Bhawal, U. K., Ozaki, Y., Nishimura, M., Sugiyama, M., Sasahira, T., Nomura, Y., Sato, F., Fujimoto, K., Sasaki, N., Ikeda, M. A., Tsuji, K., Kuniyasu, H. and Kato, Y. Association of expression of receptor for advanced glycation end products and invasive activity of oral squamous cell carcinoma. *Oncology*, 2005, 69: 246-255.
- Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, 81: 1-5.
- Bianchi, M. E. HMGB1 loves company. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, 86: 573-576.
- Bianchi, M. E. and Beltrame, M. Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep.*, 2000, 1: 109-114.
- Bohnhorst, J., Rasmussen, T., Moen, S. H., Flottum, M., Knudsen, L., Borset, M., Espevik, T. and Sundan, A. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia*, 2006, 20: 1138-1144.
- Boland, G., Beran, J., Lievens, M., Sasadeusz, J., Dentico, P., Nothdurft, H., Zuckerman, J. N., Genton, B., Steffen, R., Loutan, L., Van, H. J. and Stoffel, M. Safety and immunogenicity profile of an experimental hepatitis B vaccine adjuvanted with AS04. *Vaccine*, 2004, 23: 316-320.

- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A. and Bianchi, M. E. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.*, 2003, 22: 5551-5560.
- Bourquin, C., Hotz, C., Noerenberg, D., Voelkl, A., Heidegger, S., Roetzer, L. C., Storch, B., Sandholzer, N., Wurzenberger, C., Anz, D. and Endres, S. Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance. *Cancer Res.*, 2011, 71: 5123-5133.
- Brahmi, Z., Bray, R. A. and Abrams, S. I. Evidence for an early calcium-independent event in the activation of the human natural killer cell cytolytic mechanism. *J. Immunol.*, 1985, 135: 4108-4113.
- Brandau, S., Jakob, M., Hemeda, H., Bruderek, K., Janeschik, S., Bootz, F. and Lang, S. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, 88: 1005-1015.
- Brandau, S., Trellakis, S., Bruderek, K., Schmaltz, D., Steller, G., Elian, M., Suttman, H., Schenck, M., Welling, J., Zabel, P. and Lang, S. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, 89: 311-317.
- Brennan, J. A., Boyle, J. O., Koch, W. M., Goodman, S. N., Hruban, R. H., Eby, Y. J., Couch, M. J., Forastiere, A. A. and Sidransky, D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332: 712-717.
- Brezniceanu, M. L., Volp, K., Bosser, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S. and Zornig, M. HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J.*, 2003, 17: 1295-1297.
- Broad, A., Kirby, J. A. and Jones, D. E. Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production. *Immunology*, 2007, 120: 103-111.
- Broomfield, S. A., van der Most, R. G., Prosser, A. C., Mahendran, S., Tovey, M. G., Smyth, M. J., Robinson, B. W. and Currie, A. J. Locally administered TLR7 agonists drive systemic antitumor immune responses that are enhanced by anti-CD40 immunotherapy. *J. Immunol.*, 2009, 182: 5217-5224.
- Buckner, C. D., Epstein, R. B., Rudolph, R. H., Clift, R. A., Storb, R. and Thomas, E. D. Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood*, 1970, 35: 741-750.
- BURNET, M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br. Med. J.*, 1957a, 1: 841-847.
- BURNET, M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.*, 1957b, 1: 779-786.
- BURNET, M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.*, 1957c, 1: 779-786.
- Bustin, M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19: 5237-5246.
- Cai, Z., Sanchez, A., Shi, Z., Zhang, T., Liu, M. and Zhang, D. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer Res.*, 2011, 71: 2466-2475.
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S. and Bianchi, M. E. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat. Genet.*, 1999, 22: 276-280.
- Campana, L., Bosurgi, L. and Rovere-Querini, P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008, 20: 518-523.
- Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R. and Ley, T. J. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.*, 2007, 27: 635-646.
- Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M. and Demengeot, J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 2003, 197: 403-411.
- Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H. and Delneste, Y. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J. Immunol.*, 2005, 175: 1551-1557.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B. C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E. and Banham, A. H. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, 2006, 108: 2957-2964.

- Casares, N., Pequignot, M. O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., Coutant, F., Metivier, D., Pichard, E., Aucouturier, P., Pierron, G., Garrido, C., Zitvogel, L. and Kroemer, G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.*, 2005, 202: 1691-1701.
- Caskey, M., Lefebvre, F., Filali-Mouhim, A., Cameron, M. J., Goulet, J. P., Haddad, E. K., Breton, G., Trumpfheller, C., Pollak, S., Shimeliovich, I., Duque-Alarcon, A., Pan, L., Nelkenbaum, A., Salazar, A. M., Schlesinger, S. J., Steinman, R. M. and Sekaly, R. P. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J. Exp. Med.*, 2011, 208: 2357-2366.
- Cassetta, L., Fortunato, O., Adduce, L., Rizzi, C., Hering, J., Rovere-Querini, P., Bianchi, M. E., Alfano, M. and Poli, G. Extracellular high mobility group box-1 inhibits R5 and X4 HIV-1 strains replication in mononuclear phagocytes without induction of chemokines and cytokines. *AIDS*, 2009, 23: 567-577.
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I. and Lanzavecchia, A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.*, 1999, 189: 821-829.
- Champsaur, M. and Lanier, L. L. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol. Rev.*, 2010, 235: 267-285.
- Chen, G. Y. and Nunez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, 10: 826-837.
- Chen, G. Y., Tang, J., Zheng, P. and Liu, Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science*, 2009, 323: 1722-1725.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. and Wahl, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- Naïve T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGFbeta-Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.*, 2003, 198: 1875-1886.
- Chen, Y. C., Giovannucci, E., Lazarus, R., Kraft, P., Ketkar, S. and Hunter, D. J. Sequence variants of Toll-like receptor 4 and susceptibility to prostate cancer. *Cancer Res.*, 2005, 65: 11771-11778.
- Chiffolleau, E., Heslan, J. M., Heslan, M., Louvet, C., Condamine, T. and Cuturi, M. C. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4+ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4+ CD25+ T cell. *Int. Immunol.*, 2007, 19: 193-201.
- Chikamori, K., Grozav, A. G., Kozuki, T., Grabowski, D., Ganapathi, R. and Ganapathi, M. K. DNA topoisomerase II enzymes as molecular targets for cancer chemotherapy. *Curr. Cancer Drug Targets.*, 2010, 10: 758-771.
- Chiron, D., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., Bataille, R. and Jegou, G. TLR3 ligand induces NF- $\kappa$ B activation and various fates of multiple myeloma cells depending on IFN- $\alpha$  production. *J. Immunol.*, 2009a, 182: 4471-4478.
- Chiron, D., Pellat-Deceunynck, C., Maillason, M., Bataille, R. and Jegou, G. Phosphorothioate-modified TLR9 ligands protect cancer cells against TRAIL-induced apoptosis. *J. Immunol.*, 2009b, 183: 4371-4377.
- Chong, W. P., Zhou, J., Law, H. K., Tu, W. and Lau, Y. L. Natural killer cells become tolerogenic after interaction with apoptotic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2010, 40: 1718-1727.
- Chuang, H. C., Huang, C. C., Chien, C. Y. and Chuang, J. H. Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer. *Oral Oncol.*, 2012, 48: 226-232.
- Chuang, J. H., Chuang, H. C., Huang, C. C., Wu, C. L., Du, Y. Y., Kung, M. L., Chen, C. H., Chen, S. C. and Tai, M. H. Differential toll-like receptor 3 (TLR3) expression and apoptotic response to TLR3 agonist in human neuroblastoma cells. *J. Biomed. Sci.*, 2011, 18: 65.
- Chung, D. J., Rossi, M., Romano, E., Ghith, J., Yuan, J., Munn, D. H. and Young, J. W. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood*, 2009, 114: 555-563.
- Correale, P., Rotundo, M. S., Del Vecchio, M. T., Remondo, C., Migali, C., Ginanneschi, C., Tsang, K. Y., Licchetta, A., Mannucci, S., Loiacono, L., Tassone, P., Francini, G. and Tagliaferri, P. Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *J. Immunother.*, 2010, 33: 435-441.
- Crellin, N. K., Garcia, R. V., Hadisfar, O., Allan, S. E., Steiner, T. S. and Levings, M. K. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.*, 2005, 175: 8051-8059.

- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L. and Zou, W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.*, 2004, 10: 942-949.
- Currie, A. J., van der Most, R. G., Broomfield, S. A., Prosser, A. C., Tovey, M. G. and Robinson, B. W. Targeting the effector site with IFN- $\alpha$ -inducing TLR ligands reactivates tumor-resident CD8 T cell responses to eradicate established solid tumors. *J. Immunol.*, 2008, 180: 1535-1544.
- Dannull, J., Su, Z., Rizzieri, D., Yang, B. K., Coleman, D., Yancey, D., Zhang, A., Dahm, P., Chao, N., Gilboa, E. and Vieweg, J. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115: 3623-3633.
- Davidson, H. C., Leibowitz, M. S., Lopez-Albaitero, A. and Ferris, R. L. Immunotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncol.*, 2009, 45: 747-751.
- de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Tanaka, Y., Wierenga, E. A., Yazdanbakhsh, M. and Kapsenberg, M. L. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.*, 2002, 168: 1704-1709.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. and Robson, S. C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.*, 2007, 204: 1257-1265.
- DeMarco, R. A., Fink, M. P. and Lotze, M. T. Monocytes promote natural killer cell interferon gamma production in response to the endogenous danger signal HMGB1. *Mol. Immunol.*, 2005, 42: 433-444.
- Diebold, S. S., Massacrier, C., Akira, S., Paturel, C., Morel, Y. and Reis e Sousa Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur. J. Immunol.*, 2006, 36: 3256-3267.
- DiNorcia, J., Moroziewicz, D. N., Ippagunta, N., Lee, M. K., Foster, M., Rotterdam, H. Z., Bao, F., Zhou, Y. S., Yan, S. F., Emond, J., Schmidt, A. M. and Allendorf, J. D. RAGE signaling significantly impacts tumorigenesis and hepatic tumor growth in murine models of colorectal carcinoma. *J. Gastrointest. Surg.*, 2010, 14: 1680-1690.
- DRESSER, D. W. Effectiveness of lipid and lipidophilic substances as adjuvants. *Nature*, 1961, 191: 1169-1171.
- DRESSER, D. W. Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigen. *Immunology*, 1962, 5: 378-388.
- Dudek, A. Z., Yunis, C., Harrison, L. I., Kumar, S., Hawkinson, R., Cooley, S., Vasilakos, J. P., Gorski, K. S. and Miller, J. S. First in human phase I trial of 852A, a novel systemic toll-like receptor 7 agonist, to activate innate immune responses in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13: 7119-7125.
- Dumitriu, I. E., Baruah, P., Valentinis, B., Voll, R. E., Herrmann, M., Nawroth, P. P., Arnold, B., Bianchi, M. E., Manfredi, A. A. and Rovere-Querini, P. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J. Immunol.*, 2005, 174: 7506-7515.
- Dummer, R., Hauschild, A., Becker, J. C., Grob, J. J., Schadendorf, D., Tebbs, V., Skalsky, J., Kaehler, K. C., Moosbauer, S., Clark, R., Meng, T. C. and Urosevic, M. An exploratory study of systemic administration of the toll-like receptor-7 agonist 852A in patients with refractory metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14: 856-864.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. and Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.*, 2002, 3: 991-998.
- Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie*, 1909, [http://www.pei.de/DE/institut/paul-ehrlich/publikationen/paul-ehrlich-publikationen.html?\\_\\_nnn=true](http://www.pei.de/DE/institut/paul-ehrlich/publikationen/paul-ehrlich-publikationen.html?__nnn=true): 117-164. 04.06.2012
- Elangovan, I., Thirugnanam, S., Chen, A., Zheng, G., Bosland, M. C., Kajdacsy-Balla, A. and Gnanasekar, M. Targeting receptor for advanced glycation end products (RAGE) expression induces apoptosis and inhibits prostate tumor growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 417: 1133-1138.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y. and Henson, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. *J. Clin. Invest.*, 1998, 101: 890-898.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M. C. and Puccetti, P. The combined effects of tryptophan



- starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.*, 2006, 176: 6752-6761.
- Fang, J., Nakamura, H. and Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, 63: 136-151.
- Ferguson, T. A., Herndon, J., Elzey, B., Griffith, T. S., Schoenberger, S. and Green, D. R. Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness. *J. Immunol.*, 2002, 168: 5589-5595.
- Field, A. K., Tytell, A. A., Lampson, G. P. and Hilleman, M. R. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, 58: 1004-10.
- Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. and Roth, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, 81: 28-37.
- Foss, F. M. DAB(389)IL-2 (ONTAK): a novel fusion toxin therapy for lymphoma. *Clin. Lymphoma*, 2000, 1: 110-116.
- Friboulet, L., Gourzones, C., Tsao, S. W., Morel, Y., Paturel, C., Temam, S., Uzan, C. and Busson, P. Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC. Cancer*, 2010, 10: 327.
- Fritz, G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem. Sci.*, 2011, 36: 625-632.
- Fujimoto, S., Greene, M. and Schon, A. H. Immunosuppressor T cells in tumor bearing host. *Immunol. Commun.*, 1975, 4: 201-217.
- Gallucci, S., Lolkema, M. and Matzinger, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.*, 1999, 5: 1249-1255.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death. Differ.*, 2007, 14: 1237-1243.
- Gao, Y., Herndon, J. M., Zhang, H., Griffith, T. S. and Ferguson, T. A. Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1998, 188: 887-896.
- Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L. V., Torrisi, M. R., Bianchi, M. E. and Rubartelli, A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.*, 2002, 3: 995-1001.
- Garfinkel, S., Haines, D. S., Brown, S., Wessendorf, J., Gillespie, D. H. and Maciag, T. Interleukin-1 alpha mediates an alternative pathway for the antiproliferative action of poly(I.C) on human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267: 24375-24378.
- Garin, M. I., Chu, C. C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R. and Lechler, R. I. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, 2007, 109: 2058-2065.
- Geisel, J., Kahl, F., Muller, M., Wagner, H., Kirschning, C. J., Autenrieth, I. B. and Frick, J. S. IL-6 and maturation govern TLR2 and TLR4 induced TLR agonist tolerance and cross-tolerance in dendritic cells. *J. Immunol.*, 2007, 179: 5811-5818.
- Geisse, J., Caro, I., Lindholm, J., Golitz, L., Stampone, P. and Owens, M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2004, 50: 722-733.
- GEKID and RKI Krebs in Deutschland 2007-2008. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, 2012, 8.: 0.
- Gelman, A. E., Zhang, J., Choi, Y. and Turka, L. A. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J. Immunol.*, 2004, 172: 6065-6073.
- Gershon, R. K., Cohen, P., Hencin, R. and Liebhaver, S. A. Suppressor T cells. *J. Immunol.*, 1972, 108: 586-590.
- Gershon, R. K. and Kondo, K. Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 1971, 21: 903-914.
- Gershon, R. K., Mokyr, M. B. and Mitchell, M. S. Activation of suppressor T cells by tumour cells and specific antibody. *Nature*, 1974, 250: 594-596.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lecesne, A., Robert, C., Blay, J. Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchenker, W., Martin, F. and Zitvogel, L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.*, 2005a, 202: 1075-1085.

- Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B. and Zitvogel, L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 2005b, 202: 919-929.
- Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., Oesterich, J. L., Gorden, K. B., Qiu, X., McKane, S. W., Noelle, R. J., Miller, R. L., Kedl, R. M., Fitzgerald-Bocarsly, P., Tomai, M. A. and Vasilakos, J. P. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol.*, 2002, 218: 74-86.
- Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., Zahurak, M. L., Daniel, R. W., Viglione, M., Symer, D. E., Shah, K. V. and Sidransky, D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, 92: 709-720.
- Girart, M. V., Fuertes, M. B., Domaica, C. I., Rossi, L. E. and Zwirner, N. W. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J. Immunol.*, 2007, 179: 3472-3479.
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S. and Colonna, M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 2006, 103: 8459-8464.
- Gkoulioni, V., Eleftheriadou, A., Yiotakis, I., Ferekidou, E., Chrisovergis, A., Lazaris, A. C. and Kandiloros, D. The efficacy of imiquimod on dysplastic lesions of the oral mucosa: an experimental model. *Anticancer Res.*, 2010, 30: 2891-2896.
- Gnjatic, S., Sawhney, N. B. and Bhardwaj, N. Toll-like receptor agonists: are they good adjuvants? *Cancer J.*, 2010, 16: 382-391.
- Goldszmid, R. S., Idoyaga, J., Bravo, A. I., Steinman, R., Mordoh, J. and Wainstok, R. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J. Immunol.*, 2003, 171: 5940-5947.
- Gonzalez-Navajas, J. M., Fine, S., Law, J., Datta, S. K., Nguyen, K. P., Yu, M., Corr, M., Katakura, K., Eckman, L., Lee, J. and Raz, E. TLR4 signaling in effector CD4+ T cells regulates TCR activation and experimental colitis in mice. *J. Clin. Invest.*, 2010, 120: 570-581.
- Gorden, K. B., Gorski, K. S., Gibson, S. J., Kedl, R. M., Kieper, W. C., Qiu, X., Tomai, M. A., Alkan, S. S. and Vasilakos, J. P. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J. Immunol.*, 2005, 174: 1259-1268.
- Gordon, J. and MacLean, L. D. A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro. *Nature*, 1965, 208: 795-796.
- Gorski, K. S., Waller, E. L., Bjornton-Severson, J., Hanten, J. A., Riter, C. L., Kieper, W. C., Gorden, K. B., Miller, J. S., Vasilakos, J. P., Tomai, M. A. and Alkan, S. S. Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists. *Int. Immunol.*, 2006, 18: 1115-1126.
- Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L. and Kroemer, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, 9: 353-363.
- Green, D. S., Bodman-Smith, M. D., Dalglish, A. G. and Fischer, M. D. Phase I/II study of topical imiquimod and intralesional interleukin-2 in the treatment of accessible metastases in malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.*, 2007, 156: 337-345.
- Greisman, S. E., Young, E. J., Workman, J. B., Ollodart, R. M. and Hornick, R. B. Mechanisms of endotoxin tolerance. The role of the spleen. *J. Clin. Invest.*, 1975, 56: 1597-1607.
- Grivnennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010, 140: 883-899.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P. and Ley, T. J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 2004, 21: 589-601.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 1997, 389: 737-742.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100: 57-70.
- Hardwick, J. M. Apoptosis in viral pathogenesis. *Cell Death. Differ.*, 2001, 8: 109-110.
- Harrison, C. J., Jenski, L., Voychekovski, T. and Bernstein, D. I. Modification of immunological responses and clinical disease during topical R-837 treatment of genital HSV-2 infection. *Antiviral Res.*, 1988, 10: 209-223.

- Harrison, L. I., Astry, C., Kumar, S. and Yunis, C. Pharmacokinetics of 852A, an imidazoquinoline Toll-like receptor 7-specific agonist, following intravenous, subcutaneous, and oral administrations in humans. *J. Clin. Pharmacol.*, 2007, 47: 962-969.
- Hasan, U. A., Trinchieri, G. and Vlach, J. Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 20620-20627.
- Hayashi, T., Crain, B., Corr, M., Chan, M., Cottam, H. B., Maj, R., Barberis, A., Leoni, L. and Carson, D. A. Intravesical Toll-like receptor 7 agonist R-837: optimization of its formulation in an orthotopic mouse model of bladder cancer. *Int. J. Urol.*, 2010, 17: 483-490.
- Hayashi, T., Gray, C. S., Chan, M., Tawatao, R. I., Ronacher, L., McGargill, M. A., Datta, S. K., Carson, D. A. and Corr, M. Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, 106: 2764-2769.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004, 303: 1526-1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 2002, 3: 196-200.
- Herbst, R. S., Arquette, M., Shin, D. M., Dicke, K., Vokes, E. E., Azarnia, N., Hong, W. K. and Kies, M. S. Phase II multicenter study of the epidermal growth factor receptor antibody cetuximab and cisplatin for recurrent and refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.*, 2005, 23: 5578-5587.
- Hirabayashi, K., Yano, J., Inoue, T., Yamaguchi, T., Tanigawara, K., Smyth, G. E., Ishiyama, K., Ohgi, T., Kimura, K. and Irimura, T. Inhibition of cancer cell growth by polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome complex: a new biological activity. *Cancer Res.*, 1999, 59: 4325-4333.
- Hirata, K., Takada, M., Suzuki, Y. and Kuroda, Y. Expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human biliary cancer cells. *Hepatology*, 2003, 50: 1205-1207.
- Hofbauer, G. F., Kamarashev, J., Geertsen, R., Boni, R. and Dummer, R. Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma Res.*, 1998, 8: 337-343.
- Hoffmann, T. K., Dworacki, G., Tsukihito, T., Meidenbauer, N., Gooding, W., Johnson, J. T. and Whiteside, T. L. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin. Cancer Res.*, 2002, 8: 2553-2562.
- Hokey, D. A., Larregina, A. T., Erdos, G., Watkins, S. C. and Falo, L. D., Jr. Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity. *Cancer Res.*, 2005, 65: 10059-10067.
- Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J. X., Nagashima, M., Lundh, E. R., Vijay, S., Nitecki, D. and . The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 25752-25761.
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, 299: 1057-1061.
- Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K. L., Chen, Y., Chen, S. H., Mayer, L., Unkeless, J. C. and Xiong, H. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.*, 2005, 65: 5009-5014.
- Huang, L. F., Yao, Y. M., Zhang, L. T., Dong, N., Yu, Y. and Sheng, Z. Y. The effect of high-mobility group box 1 protein on activity of regulatory T cells after thermal injury in rats. *Shock*, 2009a, 31: 322-329.
- Huang, S. J., Hijnen, D., Murphy, G. F., Kupper, T. S., Calarese, A. W., Mollet, I. G., Schanbacher, C. F., Miller, D. M., Schmults, C. D. and Clark, R. A. Imiquimod enhances IFN-gamma production and effector function of T cells infiltrating human squamous cell carcinomas of the skin. *J. Invest Dermatol.*, 2009b, 129: 2676-2685.
- Hunder, N. N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D. W., Reilly, J. Z., Rodmyre, R., Jungbluth, A., Gnjjatic, S., Thompson, J. A. and Yee, C. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.*, 2008, 358: 2698-2703.
- Huttunen, H. J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A. J. and Rauvala, H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphotericin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res.*, 2002, 62: 4805-4811.

- Hwang, P. F., Porterfield, N., Pannell, D., Davis, T. A. and Elster, E. A. Trauma is danger. *J. Transl. Med.*, 2011, 9: 92.
- Imamura, T., Izumi, H., Nagatani, G., Ise, T., Nomoto, M., Iwamoto, Y. and Kohno, K. Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 7534-7540.
- Ishiguro, H., Nakaigawa, N., Miyoshi, Y., Fujinami, K., Kubota, Y. and Uemura, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development. *Prostate*, 2005, 64: 92-100.
- Ishihara, K., Tsutsumi, K., Kawane, S., Nakajima, M. and Kasaoka, T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett.*, 2003, 550: 107-113.
- Ishii, K. J., Suzuki, K., Coban, C., Takeshita, F., Itoh, Y., Matoba, H., Kohn, L. D. and Klinman, D. M. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J. Immunol.*, 2001, 167: 2602-2607.
- Ito, I., Fukazawa, J. and Yoshida, M. Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282: 16336-16344.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. and Sakaguchi, S. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.*, 1999, 162: 5317-5326.
- Jakob, M., Hemeda, H., Janeschik, S., Bootz, F., Rotter, N., Lang, S. and Brandau, S. Human nasal mucosa contains tissue-resident immunologically responsive mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev.*, 2010, 19: 635-644.
- Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1989, 54 Pt 1: 1-13.
- Jego, G., Bataille, R., Geffroy-Luseau, A., Descamps, G. and Pellat-Deceunynck, C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*, 2006, 20: 1130-1137.
- Jeron, A., Pfoertner, S., Bruder, D., Geffers, R., Hammerer, P., Hofmann, R., Buer, J. and Schrader, A. J. Frequency and gene expression profile of regulatory T cells in renal cell carcinoma. *Tumour. Biol.*, 2009, 30: 160-170.
- Jiang, H., Lu, Z., Pan, S., Sun, B., Meng, F., Tan, H., Meng, Q. and Sun, X. Opposite effects of donor apoptotic versus necrotic splenocytes on splenic allograft tolerance. *J. Surg. Res.*, 2006, 136: 247-254.
- Jiang, Q., Wei, H. and Tian, Z. Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC. Cancer*, 2008, 8: 12.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. and Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986, 321: 522-525.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J. and Enk, A. H. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.*, 2002, 196: 255-260.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F. and Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012.
- Kadowaki, N., Antonenko, S. and Liu, Y. J. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J. Immunol.*, 2001, 166: 2291-2295.
- Kang, H. J., Lee, H., Choi, H. J., Youn, J. H., Shin, J. S., Ahn, Y. H., Yoo, J. S., Paik, Y. K. and Kim, H. Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers. *Lab Invest*, 2009, 89: 948-959.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T. and Akira, S. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.*, 2008, 205: 1601-1610.
- Kawai, T. and Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, 34: 637-650.
- Kawai, T. and Akira, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, 1143: 1-20.

- Kelly, M. G., Alvero, A. B., Chen, R., Silasi, D. A., Abrahams, V. M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T. and Mor, G. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2006, 66: 3859-3868.
- Khong, H. T. and Restifo, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat. Immunol.*, 2002, 3: 999-1005.
- Kim, E. S., Kies, M. and Herbst, R. S. Novel therapeutics for head and neck cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 2002, 14: 334-342.
- Kirkwood, J. M. and Gershon, R. K. A role for suppressor T cells in immunological enhancement of tumor growth. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 1974, 19: 157-164.
- Koch, M., Chitayat, S., Dattilo, B. M., Schiefner, A., Diez, J., Chazin, W. J. and Fritz, G. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure.*, 2010, 18: 1342-1352.
- Kohler, G. and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495-497.
- Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G. S., Xu, D. and Liew, F. Y. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101: 3029-3034.
- Kono, H. and Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, 8: 279-289.
- Kotera, Y., Shimizu, K. and Mule, J. J. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res.*, 2001, 61: 8105-8109.
- Kovalcsik, E., Lowe, K., Fischer, M., Dalgleish, A. and Bodman-Smith, M. D. Poly(I:C)-induced tumour cell death leads to DC maturation and Th1 activation. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2011, 60: 1609-1624.
- Krown, S. E., Kerr, D., Stewart, W. E., Field, A. K. and Oettgen, H. F. Phase I trials of poly(I,C) complexes in advanced cancer. *J. Biol. Response Mod.*, 1985, 4: 640-649.
- Kubler, K., Cho, P. C., Gehrke, N., Riemann, S., Dassler, J., Coch, C., Landsberg, J., Wimmenauer, V., Polcher, M., Rudlowski, C., Tuting, T., Kuhn, W., Hartmann, G. and Barchet, W. Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 2011, 41: 3028-3039.
- Kubota, N., Ebihara, T., Matsumoto, M., Gando, S. and Seya, T. IL-6 and IFN-alpha from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 391: 1421-1426.
- Kundu, S. D., Lee, C., Billips, B. K., Habermacher, G. M., Zhang, Q., Liu, V., Wong, L. Y., Klumpp, D. J. and Thumbikat, P. The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *Prostate*, 2008, 68: 223-229.
- Kuniyasu, H., Chihara, Y. and Takahashi, T. Co-expression of receptor for advanced glycation end products and the ligand amphoterin associates closely with metastasis of colorectal cancer. *Oncol. Rep.*, 2003, 10: 445-448.
- Kuniyasu, H., Oue, N., Wakikawa, A., Shigeishi, H., Matsutani, N., Kuraoka, K., Ito, R., Yokozaki, H. and Yasui, W. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J. Pathol.*, 2002, 196: 163-170.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. and Kobayashi, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol.*, 2003, 171: 4672-4679.
- Kuss, I., Donnenberg, A. D., Gooding, W. and Whiteside, T. L. Effector CD8+CD45RO-CD27-T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br. J. Cancer*, 2003, 88: 223-230.
- Kuss, I., Hathaway, B., Ferris, R. L., Gooding, W. and Whiteside, T. L. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10: 3755-3762.
- la, S. A., Ferrari, D., Di, V. F., Idzko, M., Norgauer, J. and Girolomoni, G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, 73: 339-343.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T. and Golenbock, D. T. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.*, 2004, 5: 190-198.

- Lech, M., vila-Ferrufino, A., Skuginna, V., Susanti, H. E. and Anders, H. J. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int. Immunol.*, 2010, 22: 717-728.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 1996, 86: 973-983.
- Lesterhuis, W. J., Schreibelt, G., Scharenborg, N. M., Brouwer, H. M., Gerritsen, M. J., Croockewit, S., Coulie, P. G., Torensma, R., Adema, G. J., Figdor, C. G., de, V., I and Punt, C. J. Wild-type and modified gp100 peptide-pulsed dendritic cell vaccination of advanced melanoma patients can lead to long-term clinical responses independent of the peptide used. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2011, 60: 249-260.
- Lewkowicz, P., Lewkowicz, N., Sasiak, A. and Tchorzewski, H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J. Immunol.*, 2006, 177: 7155-7163.
- Li, J., Kokkola, R., Tabibzadeh, S., Yang, R., Ochani, M., Qiang, X., Harris, H. E., Czura, C. J., Wang, H., Ulloa, L., Wang, H., Warren, H. S., Moldawer, L. L., Fink, M. P., Andersson, U., Tracey, K. J. and Yang, H. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol. Med.*, 2003, 9: 37-45.
- Li, V. W., Li, W. W., Talcott, K. E. and Zhai, A. W. Imiquimod as an antiangiogenic agent. *J. Drugs Dermatol.*, 2005, 4: 708-717.
- Li, X., Kostareli, E., Suffner, J., Garbi, N. and Hammerling, G. J. Efficient Treg depletion induces T-cell infiltration and rejection of large tumors. *Eur. J. Immunol.*, 2010, 40: 3325-3335.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., Tybulewicz, V., Vignali, D. and Clynes, R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.*, 2008, 180: 5916-5926.
- Liang, X., Chavez, A. R., Schapiro, N. E., Loughran, P., Thorne, S. H., Amoscato, A. A., Zeh, H. J., Beer-Stolz, D., Lotze, M. T. and de Vera, M. E. Ethyl pyruvate administration inhibits hepatic tumor growth. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, 86: 599-607.
- Liao, S. J., Zhou, Y. H., Yuan, Y., Li, D., Wu, F. H., Wang, Q., Zhu, J. H., Yan, B., Wei, J. J., Zhang, G. M. and Feng, Z. H. Triggering of Toll-like receptor 4 on metastatic breast cancer cells promotes alphavbeta3-mediated adhesion and invasive migration. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2011.
- Liberman, A. C., Refojo, D., ntunica-Noguerol, M., Holsboer, F. and Arzt, E. Underlying mechanisms of cAMP- and glucocorticoid-mediated inhibition of FasL expression in activation-induced cell death. *Mol. Immunol.*, 2012.
- Lim, S. C., Choi, J. E., Kim, C. H., Duong, H. Q., Jeong, G. A., Kang, H. S. and Han, S. I. Ethyl pyruvate induces necrosis-to-apoptosis switch and inhibits high mobility group protein 1 release in A549 lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.*, 2007, 20: 187-192.
- Lin, K. Y., Lu, D., Hung, C. F., Peng, S., Huang, L., Jie, C., Murillo, F., Rowley, J., Tsai, Y. C., He, L., Kim, D. J., Jaffee, E., Pardoll, D. and Wu, T. C. Ectopic expression of vascular cell adhesion molecule-1 as a new mechanism for tumor immune evasion. *Cancer Res.*, 2007, 67: 1832-1841.
- Lion, E., Anguille, S., Berneman, Z. N., Smits, E. L. and Van, T., V Poly(I:C) enhances the susceptibility of leukemic cells to NK cell cytotoxicity and phagocytosis by DC. *PLoS. ONE.*, 2011, 6: e20952.
- Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D. and Liew, F. Y. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006a, 103: 7048-7053.
- Liu, H., Schwartz, M. J., Hwang, D. H. and Scherr, D. S. Tumour growth inhibition by an imidazoquinoline is associated with c-Myc down-regulation in urothelial cell carcinoma. *BJU. Int.*, 2008a, 101: 894-901.
- Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A. and Quesnel, B. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*, 2007a, 110: 296-304.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J. N., Shiloach, J., Segal, D. M. and Davies, D. R. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*, 2008b, 320: 379-381.
- Liu, V. C., Wong, L. Y., Jang, T., Shah, A. H., Park, I., Yang, X., Zhang, Q., Lonning, S., Teicher, B. A. and Lee, C. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T Cells into CD4+CD25+ T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF- $\beta$ . *J. Immunol.*, 2007b, 178: 2883-2892.

- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St, G. B., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F. and Bluestone, J. A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.*, 2006b, 203: 1701-1711.
- Liu, Y., Xie, C., Zhang, X., Huang, D., Zhou, X., Tan, P., Qi, L., Hu, G., Tian, Y. and Qiu, Y. Elevated expression of HMGB1 in squamous-cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance. *Eur. J. Cancer*, 2010, 46: 3007-3015.
- Liu, Z., Falo, L. D., Jr. and You, Z. Knockdown of HMGB1 in Tumor Cells Attenuates Their Ability To Induce Regulatory T Cells and Uncovers Naturally Acquired CD8 T Cell-Dependent Antitumor Immunity. *J. Immunol.*, 2011, 187: 118-125.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- Lore, K., Betts, M. R., Brenchley, J. M., Kuruppu, J., Khojasteh, S., Perfetto, S., Roederer, M., Seder, R. A. and Koup, R. A. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J. Immunol.*, 2003, 171: 4320-4328.
- Lorimore, S. A., Coates, P. J., Scobie, G. E., Milne, G. and Wright, E. G. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene*, 2001, 20: 7085-7095.
- Lotze, M. T. and Tracey, K. J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, 5: 331-342.
- Majewski, S., Marczak, M., Mlynarczyk, B., Benninghoff, B. and Jablonska, S. Imiquimod is a strong inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *Int. J. Dermatol.*, 2005, 44: 14-19.
- Malyguine, A. M., Strobl, S. L. and Shurin, M. R. Immunological monitoring of the tumor immunoenvironment for clinical trials. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, 61: 239-247.
- Mandapathil, M., Hildorfer, B., Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., Lang, S., Jackson, E. K., Gorelik, E. and Whiteside, T. L. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285: 7176-7186.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 2002, 23: 549-555.
- Marcus, B., Arenberg, D., Lee, J., Kleer, C., Chepeha, D. B., Schmalbach, C. E., Islam, M., Paul, S., Pan, Q., Hanash, S., Kuick, R., Merajver, S. D. and Teknos, T. N. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 2004, 101: 2779-2787.
- Mathe, G. Active immunotherapy. *Adv. Cancer Res.*, 1971, 14: 1-36.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K. and Seya, T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 293: 1364-1369.
- Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, 12: 991-1045.
- Meagher, L. C., Savill, J. S., Baker, A., Fuller, R. W. and Haslett, C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J. Leukoc. Biol.*, 1992, 52: 269-273.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, 388: 394-397.
- Mellman, I., Coukos, G. and Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 2011, 480: 480-489.
- Messmer, D., Yang, H., Telusma, G., Knoll, F., Li, J., Messmer, B., Tracey, K. J. and Chiorazzi, N. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J. Immunol.*, 2004, 173: 307-313.
- Miller, A. K., Dusing, R., Meggison, A. and Aires, D. Regression of internal melanoma metastases following application of topical imiquimod to overlying skin. *J. Drugs Dermatol.*, 2011, 10: 302-305.
- Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R. and Levy, R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N. Engl. J. Med.*, 1982, 306: 517-522.

- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D. and Kaveri, S. V. Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.*, 2004, 172: 4676-4680.
- Mitola, S., Belleri, M., Urbinati, C., Coltrini, D., Sparatore, B., Pedrazzi, M., Melloni, E. and Presta, M. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J. Immunol.*, 2006, 176: 12-15.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorocho, G. and Sakaguchi, S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.*, 2009, 30: 899-911.
- Morse, M. A., Chapman, R., Powderly, J., Blackwell, K., Keler, T., Green, J., Riggs, R., He, L. Z., Ramakrishna, V., Vitale, L., Zhao, B., Butler, S. A., Hobeika, A., Osada, T., Davis, T., Clay, T. and Lyerly, H. K. Phase I study utilizing a novel antigen-presenting cell-targeted vaccine with Toll-like receptor stimulation to induce immunity to self-antigens in cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17: 4844-4853.
- Morton, D. L., Eilber, F. R., Joseph, W. L., Wood, W. C., Trahan, E. and Ketcham, A. S. Immunological factors in human sarcomas and melanomas: a rational basis for immunotherapy. *Ann. Surg.*, 1970, 172: 740-749.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65: 55-63.
- Mumm, J. B., Emmerich, J., Zhang, X., Chan, I., Wu, L., Mauze, S., Blaisdell, S., Basham, B., Dai, J., Grein, J., Sheppard, C., Hong, K., Cutler, C., Turner, S., LaFace, D., Kleinschek, M., Judo, M., Ayanoglu, G., Langowski, J., Gu, D., Paporello, B., Murphy, E., Sriram, V., Naravula, S., Desai, B., Medicherla, S., Seghezzi, W., McClanahan, T., Cannon-Carlson, S., Beebe, A. M. and Oft, M. IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell*, 2011, 20: 781-796.
- Muzio, M., Natoli, G., Sacconi, S., Levrero, M. and Mantovani, A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor  $\kappa$ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.*, 1998, 187: 2097-2101.
- Nakamura, K., Kitani, A. and Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.*, 2001, 194: 629-644.
- Narayan, R., Nguyen, H., Bentow, J. J., Moy, L., Lee, D. K., Greger, S., Haskell, J., Vanchinathan, V., Chang, P. L., Tsui, S., Konishi, T., Comin-Anduix, B., Dauphine, C., Vargas, H. I., Economou, J. S., Ribas, A., Bruhn, K. W. and Craft, N. Immunomodulation by imiquimod in patients with high-risk primary melanoma. *J. Invest Dermatol.*, 2012, 132: 163-169.
- Nemunaitis, J. and Nemunaitis, J. Head and neck cancer: response to p53-based therapeutics. *Head Neck*, 2011, 33: 131-134.
- Nieters, A., Beckmann, L., Deeg, E. and Becker, N. Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor  $\alpha$  and lymphoma risk. *Genes Immun.*, 2006, 7: 615-624.
- Nishiya, T. and Defranco, A. L. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 19008-19017.
- Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S. and Defranco, A. L. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 37107-37117.
- North, R. J. and Bursuker, I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1<sup>+</sup>2<sup>-</sup> suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1<sup>+</sup>2<sup>+</sup> effector T cells. *J. Exp. Med.*, 1984, 159: 1295-1311.
- Nowak, A. K., Lake, R. A., Marzo, A. L., Scott, B., Heath, W. R., Collins, E. J., Frelinger, J. A. and Robinson, B. W. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J. Immunol.*, 2003, 170: 4905-4913.
- O'Neill, L. A., Bryant, C. E. and Doyle, S. L. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 2009, 61: 177-197.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van, E. P., Ciccocioppo, F., Piacentini, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.*, 2007, 13: 54-61.



- Okada, H., Kalinski, P., Ueda, R., Hoji, A., Kohanbash, G., Donegan, T. E., Mintz, A. H., Engh, J. A., Bartlett, D. L., Brown, C. K., Zeh, H., Holtzman, M. P., Reinhart, T. A., Whiteside, T. L., Butterfield, L. H., Hamilton, R. L., Potter, D. M., Pollack, I. F., Salazar, A. M. and Lieberman, F. S. Induction of CD8<sup>+</sup> T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with {alpha}-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol.*, 2011, 29: 330-336.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S. Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, 105: 10113-10118.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. and Nakayama, E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 1999, 59: 3128-3133.
- Ooi, T., Barnetson, R. S., Zhuang, L., McKane, S., Lee, J. H., Slade, H. B. and Halliday, G. M. Imiquimod-induced regression of actinic keratosis is associated with infiltration by T lymphocytes and dendritic cells: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.*, 2006, 154: 72-78.
- Orlova, V. V., Choi, E. Y., Xie, C., Chavakis, E., Bierhaus, A., Ihanus, E., Ballantyne, C. M., Gahmberg, C. G., Bianchi, M. E., Nawroth, P. P. and Chavakis, T. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J.*, 2007, 26: 1129-1139.
- Ormandy, L. A., Hillemann, T., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Greten, T. F. and Korangy, F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 2005, 65: 2457-2464.
- Ortho Multicenter Transplant Study Group A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N. Engl. J. Med.*, 1985, 313: 337-342.
- Palumbo, R., Galvez, B. G., Pusterla, T., de, M. F., Cossu, G., Marcu, K. B. and Bianchi, M. E. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *J. Cell Biol.*, 2007, 179: 33-40.
- Palumbo, R., Sampaulesi, M., de, M. F., Tonlorenzi, R., Colombetti, S., Mondino, A., Cossu, G. and Bianchi, M. E. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J. Cell Biol.*, 2004, 164: 441-449.
- Pandiyar, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. and Lenardo, M. J. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.*, 2007, 8: 1353-1362.
- Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J. Y., Strassheim, D., Ishizaka, A. and Abraham, E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 7370-7377.
- Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K. S., Peng, W., Fu, T., Wang, D. Y., Li, Y., Wang, H. Y. and Wang, R. F. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science*, 2005, 309: 1380-1384.
- Peng, S., Geng, J., Sun, R., Tian, Z. and Wei, H. Polyinosinic-polycytidylic acid liposome induces human hepatoma cells apoptosis which correlates to the up-regulation of RIG-I like receptors. *Cancer Sci.*, 2009, 100: 529-536.
- Perrot, I., Deauvieu, F., Massacrier, C., Hughes, N., Garrone, P., Durand, I., Demaria, O., Viaud, N., Gauthier, L., Blery, M., Bonnefoy-Berard, N., Morel, Y., Tschoop, J., Alexopoulou, L., Trinchieri, G., Paturel, C. and Caux, C. TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J. Immunol.*, 2010, 185: 2080-2088.
- Piccirillo, C. A., Letterio, J. J., Thornton, A. M., McHugh, R. S., Mamura, M., Mizuhara, H. and Shevach, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J. Exp. Med.*, 2002, 196: 237-246.
- Piro, A., Tagarelli, A., Tagarelli, G., Lagonia, P. and Quattrone, A. Paul Ehrlich: the Nobel Prize in physiology or medicine 1908. *Int. Rev. Immunol.*, 2008, 27: 1-17.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van, H. C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998, 282: 2085-2088.

- Pries, R., Hogrefe, L., Xie, L., Frenzel, H., Brocks, C., Ditz, C. and Wollenberg, B. Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer. *Int. J. Mol. Med.*, 2008, 21: 209-215.
- Raftery, M. J., Winau, F., Giese, T., Kaufmann, S. H., Schaible, U. E. and Schonrich, G. Viral danger signals control CD1d de novo synthesis and NKT cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 2008, 38: 668-679.
- Reeves, R. Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1799: 3-14.
- Reichert, T. E., Strauss, L., Wagner, E. M., Gooding, W. and Whiteside, T. L. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2002, 8: 3137-3145.
- Reiter, M. J., Testerman, T. L., Miller, R. L., Weeks, C. E. and Tomai, M. A. Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *J. Leukoc. Biol.*, 1994, 55: 234-240.
- Riker, A., Cormier, J., Panelli, M., Kammula, U., Wang, E., Abati, A., Fetsch, P., Lee, K. H., Steinberg, S., Rosenberg, S. and Marincola, F. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery*, 1999, 126: 112-120.
- Rock, K. L. and Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol.*, 2008, 3: 99-126.
- Rojas, A., Figueroa, H. and Morales, E. Fueling inflammation at tumor microenvironment: the role of multiligand/RAGE axis. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 334-341.
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A. and Dudley, M. E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2008, 8: 299-308.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C. and Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.*, 2004, 10: 909-915.
- Roteli-Martins, C., Naud, P., De, B. P., Teixeira, J., De, C. N., Zahaf, T., Sanchez, N., Geeraerts, B. and Descamps, D. Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: up to 8.4 years of follow-up. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, 8.
- Rouas, R., Lewalle, P., El, O. F., Nowak, B., Duvillier, H. and Martiat, P. Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *Int. Immunol.*, 2004, 16: 767-773.
- Rouhiainen, A., Tumova, S., Valmu, L., Kalkkinen, N. and Rauvala, H. Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). *J. Leukoc. Biol.*, 2007, 81: 49-58.
- Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentini, B., Catalanotti, F., Giazson, M., Dumitriu, I. E., Muller, S., Iannaccone, M., Traversari, C., Bianchi, M. E. and Manfredi, A. A. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.*, 2004, 5: 825-830.
- Russo, C., Cornella-Taracido, I., Galli-Stampino, L., Jain, R., Harrington, E., Isome, Y., Tavarini, S., Sammiceli, C., Nuti, S., Mbow, M. L., Valiante, N. M., Tallarico, J., De, G. E. and Soldaini, E. Small molecule Toll-like receptor 7 agonists localize to the MHC class II loading compartment of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 2011, 117: 5683-5691.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y. M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T. and Gale, M., Jr. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, 104: 582-587.
- Saito, T., Kuss, I., Dworacki, G., Gooding, W., Johnson, J. T. and Whiteside, T. L. Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5: 1263-1273.
- Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C. and Iacopetta, B. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2009, 27: 186-192.
- Salaun, B., Coste, I., Risoan, M. C., Lebecque, S. J. and Renno, T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J. Immunol.*, 2006, 176: 4894-4901.
- Salem, M. L., az-Montero, C. M., El-Naggar, S. A., Chen, Y., Moussa, O. and Cole, D. J. The TLR3 agonist poly(I:C) targets CD8+ T cells and augments their antigen-specific responses upon their adoptive transfer into naive recipient mice. *Vaccine*, 2009, 27: 549-557.
- Salem, M. L., El-Naggar, S. A., Kadima, A., Gillanders, W. E. and Cole, D. J. The adjuvant effects of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid poly (I:C) on antigen-specific CD8+ T cell responses are

- partially dependent on NK cells with the induction of a beneficial cytokine milieu. *Vaccine*, 2006, 24: 5119-5132.
- Salem, M. L., Kadima, A. N., Cole, D. J. and Gillanders, W. E. Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J. Immunother.*, 2005, 28: 220-228.
- Savage, P., Horton, V., Moore, J., Owens, M., Witt, P. and Gore, M. E. A phase I clinical trial of imiquimod, an oral interferon inducer, administered daily. *Br. J. Cancer*, 1996, 74: 1482-1486.
- Scaffidi, P., Misteli, T. and Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 2002, 418: 191-195.
- Schlueter, C., Weber, H., Meyer, B., Rogalla, P., Roser, K., Hauke, S. and Bullerdiek, J. Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am. J. Pathol.*, 2005, 166: 1259-1263.
- Schmidt, A. M., Hofmann, M., Taguchi, A., Yan, S. D. and Stern, D. M. RAGE: a multiligand receptor contributing to the cellular response in diabetic vasculopathy and inflammation. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2000, 26: 485-493.
- Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G. and Garrido, C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, 81: 15-27.
- Schnurr, M., Galambos, P., Scholz, C., Then, F., Dauer, M., Endres, S. and Eigler, A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res.*, 2001, 61: 6445-6450.
- Schnurr, M., Then, F., Galambos, P., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S. and Eigler, A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.*, 2000, 165: 4704-4709.
- Schon, M., Bong, A. B., Drewniok, C., Herz, J., Geilen, C. C., Reifemberger, J., Benninghoff, B., Slade, H. B., Gollnick, H. and Schon, M. P. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, 95: 1138-1149.
- Schon, M. P., Schon, M. and Klotz, K. N. The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a. *J. Invest Dermatol.*, 2006, 126: 1338-1347.
- Schreiber, R. D., Old, L. J. and Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 2011, 331: 1565-1570.
- Schulz, O., Diebold, S. S., Chen, M., Naslund, T. I., Nolte, M. A., Alexopoulou, L., Azuma, Y. T., Flavell, R. A., Liljestrom, P. and Reis e Sousa Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*, 2005, 433: 887-892.
- Schwartz, M. J., Liu, H., Hwang, D. H., Kawamoto, H. and Scherr, D. S. Antitumor effects of an imidazoquinoline in renal cell carcinoma. *Urology*, 2009, 73: 1156-1162.
- Semino, C., Angelini, G., Poggi, A. and Rubartelli, A. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood*, 2005, 106: 609-616.
- Shang, G. H., Jia, C. Q., Tian, H., Xiao, W., Li, Y., Wang, A. H., Dong, L. and Lin, D. J. Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer. *Respir. Med.*, 2009, 103: 1949-1953.
- Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. D. and Allison, J. P. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat. Rev. Cancer*, 2011, 11: 805-812.
- Shenghui, Z., Yixiang, H., Jianbo, W., Kang, Y., Laixi, B., Yan, Z. and Xi, X. Elevated frequencies of CD4 CD25 CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int. J. Cancer*, 2011, 129: 1373-1381.
- Shi, Y., Evans, J. E. and Rock, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 2003, 425: 516-521.
- Shi, Y., White, D., He, L., Miller, R. L. and Spaner, D. E. Toll-like receptor-7 tolerizes malignant B cells and enhances killing by cytotoxic agents. *Cancer Res.*, 2007, 67: 1823-1831.
- Shi, Y., Zheng, W. and Rock, K. L. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97: 14590-14595.

- Shimizu, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.*, 1999, 163: 5211-5218.
- Shojaei, H., Oberg, H. H., Juricke, M., Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D. and Wesch, D. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human gammadelta T cells. *Cancer Res.*, 2009, 69: 8710-8717.
- Sidky, Y. A., Borden, E. C., Weeks, C. E., Reiter, M. J., Hatcher, J. F. and Bryan, G. T. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. *Cancer Res.*, 1992, 52: 3528-3533.
- Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.*, 2012, 62: 10-29.
- Silverstein, A. M. Paul Ehrlich's passion: the origins of his receptor immunology. *Cell Immunol.*, 1999, 194: 213-221.
- Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R. and Coyle, A. J. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, 28: 367-388.
- Sitohy, B., Nagy, J. A., Jaminet, S. C. and Dvorak, H. F. Tumor-surrogate blood vessel subtypes exhibit differential susceptibility to anti-VEGF therapy. *Cancer Res.*, 2011, 71: 7021-7028.
- Smith, E. B., Schwartz, M., Kawamoto, H., You, X., Hwang, D., Liu, H. and Scherr, D. S. Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 2007, 177: 2347-2351.
- Smits, E. L., Ponsaerts, P., Berneman, Z. N. and Van, T., V The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist.*, 2008, 13: 859-875.
- Smyth, E. C., Flavin, M., Pulitzer, M. P., Gardner, G. J., Costantino, P. D., Chi, D. S., Bogatch, K., Chapman, P. B., Wolchok, J. D., Schwartz, G. K. and Carvajal, R. D. Treatment of locally recurrent mucosal melanoma with topical imiquimod. *J. Clin. Oncol.*, 2011, 29: e809-e811.
- Song, C., Chen, L. Z., Zhang, R. H., Yu, X. J. and Zeng, Y. X. Functional variant in the 3'-untranslated region of Toll-like receptor 4 is associated with nasopharyngeal carcinoma risk. *Cancer Biol. Ther.*, 2006, 5: 1285-1291.
- Soria, I., Myhre, P., Horton, V., Ellefson, P., McCarville, S., Schmitt, K. and Owens, M. Effect of food on the pharmacokinetics and bioavailability of oral imiquimod relative to a subcutaneous dose. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2000, 38: 476-481.
- Spaner, D. E., Shi, Y., White, D., Mena, J., Hammond, C., Tomic, J., He, L., Tomai, M. A., Miller, R. L., Booth, J. and Radvanyi, L. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 2006, 20: 286-295.
- Srikrishna, G. and Freeze, H. H. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia.*, 2009, 11: 615-628.
- Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.*, 1973, 137: 1142-1162.
- Stevenson, H. C., Abrams, P. G., Schoenberger, C. S., Smalley, R. B., Herberman, R. B. and Foon, K. A. A phase I evaluation of poly(I,C)-LC in cancer patients. *J. Biol. Response Mod.*, 1985, 4: 650-655.
- Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J. T. and Whiteside, T. L. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.*, 2007a, 13: 4345-4354.
- Strauss, L., Bergmann, C. and Whiteside, T. L. Functional and phenotypic characteristics of CD4+CD25highFoxp3+ Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer. *Int. J. Cancer*, 2007b, 121: 2473-2483.
- Strauss, L., Bergmann, C. and Whiteside, T. L. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.*, 2009, 182: 1469-1480.
- Strome, S. E., Voss, S., Wilcox, R., Wakefield, T. L., Tamada, K., Flies, D., Chapoval, A., Lu, J., Kasperbauer, J. L., Padley, D., Vile, R., Gastineau, D., Wettstein, P. and Chen, L. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res.*, 2002, 62: 1884-1889.
- Stros, M., Bacikova, A., Polanska, E., Stokrova, J. and Strauss, F. HMGB1 interacts with human topoisomerase IIalpha and stimulates its catalytic activity. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35: 5001-5013.
- Stros, M., Polanska, E., Struncova, S. and Pospisilova, S. HMGB1 and HMGB2 proteins up-regulate cellular expression of human topoisomerase IIalpha. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37: 2070-2086.

- Sun, E., Gao, Y., Chen, J., Roberts, A. I., Wang, X., Chen, Z. and Shi, Y. Allograft tolerance induced by donor apoptotic lymphocytes requires phagocytosis in the recipient. *Cell Death. Differ.*, 2004, 11: 1258-1264.
- Sun, J., Wiklund, F., Zheng, S. L., Chang, B., Balter, K., Li, L., Johansson, J. E., Li, G., Adami, H. O., Liu, W., Tolin, A., Turner, A. R., Meyers, D. A., Isaacs, W. B., Xu, J. and Gronberg, H. Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, 97: 525-532.
- Sundberg, E., Fasth, A. E., Palmblad, K., Harris, H. E. and Andersson, U. High mobility group box chromosomal protein 1 acts as a proliferation signal for activated T lymphocytes. *Immunobiology*, 2009, 214: 303-309.
- Sutmoller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G. and Adema, G. J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.*, 2006, 116: 485-494.
- Suzuki, H., Wang, B., Shivji, G. M., Toto, P., Amerio, P., Tomai, M. A., Miller, R. L. and Sauder, D. N. Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J. Invest Dermatol.*, 2000, 114: 135-141.
- Szajnik, M., Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Elishaev, E., Mandapathil, M., Nowak-Markwitz, E., Spaczynski, M. and Whiteside, T. L. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 2009, 28: 4353-4363.
- Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Szajnik, M., Harasymczuk, M., Boyiadzis, M., Kruk-Zagajewska, A., Szyfter, W., Zeromski, J. and Whiteside, T. L. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res.*, 2009, 69: 3105-3113.
- Taguchi, A., Blood, D. C., del, T. G., Canet, A., Lee, D. C., Qu, W., Tanji, N., Lu, Y., Lalla, E., Fu, C., Hofmann, M. A., Kislinger, T., Ingram, M., Lu, A., Tanaka, H., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D. M. and Schmidt, A. M. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*, 2000, 405: 354-360.
- Takada, M., Hirata, K., Ajiki, T., Suzuki, Y. and Kuroda, Y. Expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and MMP-9 in human pancreatic cancer cells. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51: 928-930.
- Tamassia, N., Le, M., V, Rossato, M., Donini, M., McCartney, S., Calzetti, F., Colonna, M., Bazzoni, F. and Cassatella, M. A. Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *J. Immunol.*, 2008, 181: 6563-6573.
- Tang, D., Kang, R., Cheh, C. W., Livesey, K. M., Liang, X., Schapiro, N. E., Benschop, R., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Tracey, K. J., Zeh, H. J. and Lotze, M. T. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene*, 2010a, 29: 5299-5310.
- Tang, D., Kang, R., Zeh, H. J., III and Lotze, M. T. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010b, 1799: 131-140.
- Tannapfel, A. and Weber, A. Tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical effectiveness and prognostic value. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2001, 258: 83-88.
- Taylor, K. R., Yamasaki, K., Radek, K. A., Di, N. A., Goodarzi, H., Golenbock, D., Beutler, B. and Gallo, R. L. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282: 18265-18275.
- Teng, M. W., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D. and Smyth, M. J. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, 84: 988-993.
- Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., Schlemmer, F., Zitvogel, L. and Kroemer, G. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008, 20: 504-511.
- Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., Aymeric, L., Michaud, M., Apetoh, L., Barault, L., Mendiboure, J., Pignon, J. P., Jooste, V., van, E. P., Ducreux, M., Zitvogel, L., Piard, F. and Kroemer, G. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene*, 2010, 29: 482-491.
- Testerman, T. L., Gerster, J. F., Imbertson, L. M., Reiter, M. J., Miller, R. L., Gibson, S. J., Wagner, T. L. and Tomai, M. A. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J. Leukoc. Biol.*, 1995, 58: 365-372.
- Thorburn, J., Horita, H., Redzic, J., Hansen, K., Frankel, A. E. and Thorburn, A. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death. Differ.*, 2009, 16: 175-183.

- Tokunaga, N., Murakami, T., Endo, Y., Nishizaki, M., Kagawa, S., Tanaka, N. and Fujiwara, T. Human monocyte-derived dendritic cells pulsed with wild-type p53 protein efficiently induce CTLs against p53 overexpressing human cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11: 1312-1318.
- Tormo, D., Checinska, A.,onso-Curbelo, D., Perez-Guijarro, E., Canon, E., Riveiro-Falkenbach, E., Calvo, T. G., Larribere, L., Megias, D., Mulero, F., Piris, M. A., Dash, R., Barral, P. M., Rodriguez-Peralto, J. L., Ortiz-Romero, P., Tuting, T., Fisher, P. B. and Soengas, M. S. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell*, 2009, 16: 103-114.
- Tran, N., Rose, B. R. and O'Brien, C. J. Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. *Head Neck*, 2007, 29: 64-70.
- Traversari, C., van der, B. P., Luescher, I. F., Lurquin, C., Chomez, P., Van, P. A., De, P. E., mar-Costesec, A. and Boon, T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.*, 1992, 176: 1453-1457.
- Treutiger, C. J., Mullins, G. E., Johansson, A. S., Rouhiainen, A., Rauvala, H. M., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U., Yang, H., Tracey, K. J., Andersson, J. and Palmblad, J. E. High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J. Intern. Med.*, 2003, 254: 375-385.
- Tsan, M. F. Heat shock proteins and high mobility group box 1 protein lack cytokine function. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, 89: 847-853.
- Tsukada, K., Kitazawa, T., Fukushima, A., Okugawa, S., Yanagimoto, S., Tatsuno, K., Koike, K., Nagase, H., Hirai, K. and Ota, Y. Macrophage tolerance induced by stimulation with Toll-like receptor 7/8 ligands. *Immunol. Lett.*, 2007, 111: 51-56.
- Tsukishiro, T., Donnenberg, A. D. and Whiteside, T. L. Rapid turnover of the CD8(+)CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2003, 52: 599-607.
- Ulloa, L., Ochani, M., Yang, H., Tanovic, M., Halperin, D., Yang, R., Czura, C. J., Fink, M. P. and Tracey, K. J. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, 99: 12351-12356.
- Umemura, N., Zhu, J., Mburu, Y. K., Forero, A., Hsieh, P. N., Muthuswamy, R., Kalinski, P., Ferris, R. L. and Sarkar, S. N. Defective NF-kappaB signaling in metastatic head and neck cancer cells leads to enhanced apoptosis by double-stranded RNA. *Cancer Res.*, 2012, 72: 45-55.
- Urbonaviciute, V., Furnrohr, B. G., Weber, C., Haslbeck, M., Wilhelm, S., Herrmann, M. and Voll, R. E. Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, 81: 67-74.
- Urry, Z., Xystrakis, E., Richards, D. F., McDonald, J., Sattar, Z., Cousins, D. J., Corrigan, C. J., Hickman, E., Brown, Z. and Hawrylowicz, C. M. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J. Clin. Invest.*, 2009, 119: 387-398.
- Vabulas, R. M., hmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D. and Wagner, H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 15107-15112.
- Vahle, A. K., Kerem, A., Ozturk, E., Bankfalvi, A., Lang, S. and Brandau, S. Optimization of an orthotopic murine model of head and neck squamous cell carcinoma in fully immunocompetent mice--role of toll-like-receptor 4 expressed on host cells. *Cancer Lett.*, 2012, 317: 199-206.
- Vajdic, C. M. and van Leeuwen, M. T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer*, 2009, 125: 1747-1754.
- Valzasina, B., Piconese, S., Guiducci, C. and Colombo, M. P. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res.*, 2006, 66: 4488-4495.
- van Bruggen R., Drewniak, A., Tool, A. T., Jansen, M., van, H. M., Geissler, J., van den Berg, T. K., Chapel, H. and Kuijpers, T. W. Toll-like receptor responses in IRAK-4-deficient neutrophils. *J. Innate. Immun.*, 2010, 2: 280-287.
- van Zoelen, M. A., Yang, H., Florquin, S., Meijers, J. C., Akira, S., Arnold, B., Nawroth, P. P., Bierhaus, A., Tracey, K. J. and van der, P. T. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock*, 2009, 31: 280-284.
- Venneri, M. A., De, P. M., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazzieri, R., Doglioni, C. and Naldini, L. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*, 2007, 109: 5276-5285.

- Verrier, C. S., Roodi, N., Yee, C. J., Bailey, L. R., Jensen, R. A., Bustin, M. and Parl, F. F. High-mobility group (HMG) protein HMG-1 and TATA-binding protein-associated factor TAF(II)30 affect estrogen receptor-mediated transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.*, 1997, 11: 1009-1019.
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. and Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, 29: 235-271.
- Volp, K., Brezniceanu, M. L., Bosser, S., Brabletz, T., Kirchner, T., Götzel, D., Joos, S. and Zornig, M. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut*, 2006, 55: 234-242.
- Wagner, E. Programmed drug delivery: nanosystems for tumor targeting. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2007, 7: 587-593.
- Wagner, T. L., Ahonen, C. L., Couture, A. M., Gibson, S. J., Miller, R. L., Smith, R. M., Reiter, M. J., Vasilakos, J. P. and Tomai, M. A. Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. *Cell Immunol.*, 1999, 191: 10-19.
- Wagstaff, A. J. and Perry, C. M. Topical imiquimod: a review of its use in the management of anogenital warts, actinic keratoses, basal cell carcinoma and other skin lesions. *Drugs*, 2007, 67: 2187-2210.
- Waldmann, T. A. Immunotherapy: past, present and future. *Nat. Med.*, 2003, 9: 269-277.
- Wang, C., Lisanti, M. P. and Liao, D. J. Reviewing once more the c-myc and Ras collaboration: converging at the cyclin D1-CDK4 complex and challenging basic concepts of cancer biology. *Cell Cycle*, 2011, 10: 57-67.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A. and Tracey, K. J. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999, 285: 248-251.
- Wang, H., Rayburn, E. R., Wang, W., Kandimalla, E. R., Agrawal, S. and Zhang, R. Chemotherapy and chemosensitization of non-small cell lung cancer with a novel immunomodulatory oligonucleotide targeting Toll-like receptor 9. *Mol. Cancer Ther.*, 2006, 5: 1585-1592.
- Wang, Q., Zeng, M., Wang, W. and Tang, J. The HMGB1 acidic tail regulates HMGB1 DNA binding specificity by a unique mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 360: 14-19.
- Wang, R. F., Miyahara, Y. and Wang, H. Y. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene*, 2008, 27: 181-189.
- Wang, Y., Cella, M., Gilfillan, S. and Colonna, M. Cutting edge: polyinosinic:polycytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *J. Immunol.*, 2010, 184: 2751-2755.
- Weber, A., Kirejczyk, Z., Besch, R., Potthoff, S., Leverkus, M. and Hacker, G. Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. *Cell Death. Differ.*, 2010, 17: 942-951.
- Weber, C., Müller, C., Podszuweit, A., Montino, C., Vollmer, J. and Forsbach, A. TLR3 immune modulation by unformulated siRNA or DNA and the role of CD14 (in TLR mediated effects). *Immunology*, 2012.
- Weeks, C. E. and Gibson, S. J. Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-842 in human blood cells in vitro. *J. Interferon Res.*, 1994, 14: 81-85.
- Weigert, A., Jennewein, C. and Brune, B. The liaison between apoptotic cells and macrophages--the end programs the beginning. *Biol. Chem.*, 2009, 390: 379-390.
- Weiner, H. L. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat. Immunol.*, 2001, 2: 671-672.
- Wesch, D., Beetz, S., Oberg, H. H., Marget, M., Krengel, K. and Kabelitz, D. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2006, 176: 1348-1354.
- Wheeler, D. L., Dunn, E. F. and Harari, P. M. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2010, 7: 493-507.
- Wild, C. A., Bergmann, C., Fritz, G., Schuler, P., Hoffmann, T. K., Lotfi, R., Westendorf, A., Brandau, S. and Lang, S. HMGB1 conveys immunosuppressive characteristics on regulatory and conventional T cells. *Int. Immunol.*, 2012a.[Epub ahead of print]

- Wild, C. A., Brandau, S., Lindemann, M., Lotfi, R., Hoffmann, T. K., Lang, S. and Bergmann, C. Toll-like Receptors in Regulatory T Cells of Patients With Head and Neck Cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2010, 136: 1253-1259.
- Wild, C. A., Brandau, S., Lotfi, R., Mattheis, S., Gu, X., Lang, S. and Bergmann, C. HMGB1 is overexpressed in tumor cells and promotes activity of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol.*, 2012b, 48: 409-416.
- Witt, P. L., Ritch, P. S., Reding, D., McAuliffe, T. L., Westrick, L., Grossberg, S. E. and Borden, E. C. Phase I trial of an oral immunomodulator and interferon inducer in cancer patients. *Cancer Res.*, 1993, 53: 5176-5180.
- Wood, L. J., Mukherjee, M., Dolde, C. E., Xu, Y., Maher, J. F., Bunton, T. E., Williams, J. B. and Resar, L. M. HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene. *Mol. Cell Biol.*, 2000, 20: 5490-5502.
- Wrzesinski, C., Paulos, C. M., Gattinoni, L., Palmer, D. C., Kaiser, A., Yu, Z., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells. *J. Clin. Invest.*, 2007, 117: 492-501.
- Wu, D., Ding, Y., Wang, S., Zhang, Q. and Liu, L. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *J. Pathol.*, 2008, 216: 167-175.
- Xie, J., Reverdatto, S., Frolov, A., Hoffmann, R., Burz, D. S. and Shekhtman, A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 27255-27269.
- Yan, W., Chang, Y., Liang, X., Cardinal, J. S., Huang, H., Thorne, S. H., Monga, S. P., Geller, D. A., Lotze, M. T. and Tsung, A. High mobility group box 1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases. *Hepatology*, 2012.
- Yang, D., Chen, Q., Yang, H., Tracey, K. J., Bustin, M. and Oppenheim, J. J. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, 81: 59-66.
- Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H. E., Susarla, S. M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., Czura, C. J., Wang, H., Roth, J., Warren, H. S., Fink, M. P., Fenton, M. J., Andersson, U. and Tracey, K. J. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101: 296-301.
- Yoneyama, M. and Fujita, T. Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity.*, 2008, 29: 178-181.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*, 2004, 5: 730-737.
- Youn, J. H., Oh, Y. J., Kim, E. S., Choi, J. E. and Shin, J. S. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J. Immunol.*, 2008, 180: 5067-5074.
- Zanin-Zhorov, A., Cahalon, L., Tal, G., Margalit, R., Lider, O. and Cohen, I. R. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J. Clin. Invest.*, 2006, 116: 2022-2032.
- Zanoni, I. and Granucci, F. Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors. *J. Mol. Med. (Berl)*, 2010, 88: 873-880.
- Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.*, 2002, 168: 554-561.
- Zhang, B., Jia, H., Liu, J., Yang, Z., Jiang, T., Tang, K., Li, D., Huang, C., Ma, J., Shen, G. X., Ye, D. and Huang, B. Depletion of regulatory T cells facilitates growth of established tumors: a mechanism involving the regulation of myeloid-derived suppressor cells by lipoxin A4. *J. Immunol.*, 2010, 185: 7199-7206.
- Zhang, J., Zhu, J. S., Zhou, Z., Chen, W. X. and Chen, N. W. Inhibitory effects of ethyl pyruvate administration on human gastric cancer growth via regulation of the HMGB1-RAGE and Akt pathways in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.*, 2012.
- Zhou, X. X., Jia, W. H., Shen, G. P., Qin, H. D., Yu, X. J., Chen, L. Z., Feng, Q. S., Shugart, Y. Y. and Zeng, Y. X. Sequence variants in toll-like receptor 10 are associated with nasopharyngeal carcinoma risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006, 15: 862-866.



Zhou, Z., Yamamoto, Y., Sugai, F., Yoshida, K., Kishima, Y., Sumi, H., Nakamura, H. and Sakoda, S. Hepatoma-derived growth factor is a neurotrophic factor harbored in the nucleus. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 27320-27326.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. and Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, 8: 59-73.

Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, 6: 295-307.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2: 342-350.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AGE	<i>advanced glycation end products</i>
AM-/D-/TP	Adenosimono-/di-/triphosphat
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CLR	<i>C-type lectin</i> Rezeptoren
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i>
CXCL-10	C-X-C-Motif Chemokin 10
DAMPs	<i>damage associated molecular pattern molecules</i>
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FCS	Fötales Kälberserum
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMQ	Imiquimod
KHT	Kopf-/Halstumor
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MHC	<i>major histocompatibility protein class</i>
NCS	<i>necrotic cell supernatant</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NLR	NOD-like Rezeptoren
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
p(I:C)	Poly(I:C)
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene-I</i>
RLR	RIG-I-like Rezeptoren
RNA (ss, ds)	Ribonukleinsäure ( <i>single stranded, double stranded</i> )
siRNA	small interfering RNA

TAA	tumorassoziierte Antigene
Teff	Effektor-T-Zelle
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGFβ	<i>tumor growth factor</i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptoren
Treg	regulatorische T-Zelle
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Effekt von Imiquimod auf Tumor-, Immun- und Endothelzellen.....	26
Abb. 1.2: Effekt von Poly(I:C) auf Tumor-, Immun- und Endothelzellen.....	28
Abb. 1.3: Ursprung von HMGB1 und seine Effekte auf Tumor-, Immun- und Endothelzellen.....	30
Abb. 1.4: Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	32
Abb. 3.1: Stimulationsschema von FaDu-Zellen.....	43
Abb. 3.2: Stimulationsschema für den Suppressionsassay.....	46
Abb. 3.3: Therapieschema Tierversuch.....	56
Abb. 4.1: Poly(I:C) und Imiquimod reduzieren Zellzahl der KHT-Zelllinie FaDu.....	58
Abb. 4.2: Poly(I:C) und Imiquimod induzieren Zelltod in Tumorzellen.....	59
Abb. 4.3: Poly(I:C) induziert Zytokinsekretion.....	61
Abb. 4.4: Poly(I:C) und Imiquimod regulieren MHC-I-Expression gegenläufig.....	62
Abb. 4.5: PRR-Behandlung hemmt NK-Degranulation.....	64
Abb. 4.6: Poly(I:C)-behandelte FaDu-Zellen aktivieren Monozyten.....	65
Abb. 4.7: Poly(I:C) fördert indirekt die Migration von Th1-Zellen.....	67
Abb. 4.8: CXCL-10-reicher Überstand kann HMEC-Zellzahl nicht reduzieren.....	67
Abb. 4.9: Detektion toter Zellen in Maustumoren.....	69
Abb. 4.10: Poly(I:C) und Imiquimod erhöhen Tumorzelltod <i>in vivo</i> .....	70
Abb. 4.11: Imiquimod erhöht nukleäre HMGB1-Lokalisation <i>in vivo</i> .....	71
Abb. 4.12: PRR-Injektion reguliert kaum CXCL-10-Expression.....	72
Abb. 4.13: PRR-Injektion reguliert kaum Vaskularisierung.....	73
Abb. 4.14: Poly(I:C) und Imiquimod regulieren MHC-I-Expression <i>in vivo</i> .....	74
Abb. 4.15: HMGB1-Expression ist im KHT-Gewebe erhöht.....	76
Abb. 4.16: HMGB1-Konzentration ist im Serum von KHT-Patienten erhöht.....	77
Abb. 4.17: HMGB1 ist im NCS von Tumorzellen vorhanden.....	77
Abb. 4.18: Tregs und Teffs exprimieren TLR4 und RAGE.....	78
Abb. 4.19: TLR4-Expression ist auf Tregs und Teffs von KHT-Patienten erhöht.....	79
Abb. 4.20: TLR4 und RAGE sind auf tumorinfiltrierenden Tregs und Teffs exprimiert.....	81
Abb. 4.21: HMGB1 ist ein Chemoattraktans für Tregs.....	82
Abb. 4.22: HMGB1 und NCS hemmen Funktionen von Teffs.....	84
Abb. 4.23: HMGB1 fördert suppressive Wirkung von Tregs.....	86
Abb. 4.24: HMGB1 und NCS fördern IL-10-Sekretion von Tregs gesunder Spender.....	87
Abb. 4.25: RAGE-Ligation fördert Funktionen von Tregs.....	88
Abb. 5.1: Tumorfavorisierende Eigenschaften von HMGB1.....	101
Abb. 5.2: Unterschiedliche Immunaktivierung durch Poly(I:C)- und Imiquimod-induzierten Tumorzelltod.....	107

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Mustererkennungsrezeptoren mit ihren exogenen, endogenen und synthetischen Liganden.....	12
Tab. 1.2: Meilensteine der Immuntherapie.....	21
Tab. 2.1: Liste der verwendeten Antikörper.....	38
Tab. 2.2: Liste der verwendeten Sekundärreagenzien.....	39
Tab. 2.3: Liste der verwendeten Isotypen.....	39
Tab. 2.4: Patientenmaterial.....	40
Tab. 3.1: Immunhistochemisches Färbeprotokoll.....	53
Tab. 3.2: Fluoreszenzmikroskopisches Färbeprotokoll.....	54

## 11 Anhang

### 11.1 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

#### Publikationen:

Wild, C. A.\*, Bergmann, C.\*, Fritz, G., Schuler, P., Hoffmann, T. K., Lotfi, R., Westendorf, A., Brandau, S. and Lang, S. HMGB1 conveys immunosuppressive characteristics on regulatory and conventional T cells. *Int. Immunol.*, 2012 Apr 3. [Epub ahead of print].

Wild, C. A., Brandau, S., Lotfi, R., Mattheis, S., Gu, X., Lang, S. and Bergmann, C. HMGB1 is overexpressed in tumor cells and promotes activity of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol.*, 2012, 48: 409-416.

Bergmann, C.\*, Wild, C. A.\*, Narwan, M., Lotfi, R., Lang, S. and Brandau, S. Human tumor-induced and naturally occurring Treg cells differentially affect NK cells activated by either IL-2 or target cells. *Eur. J. Immunol.*, 2011, 41: 3564-3573.

Bergmann, C., Bachmann, H. S., Bankfalvi, A., Lotfi, R., Putter, C., Wild, C. A., Schuler, P. J., Greve, J., Hoffmann, T. K., Lang, S., Scherag, A. and Lehnerdt, G. F. Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Transl. Med.*, 2011, 9: 139.

Schuler, P. J., Borger, V., Bolke, E., Habermehl, D., Matuschek, C., Wild, C. A. *et al.* and Hoffmann, T. K. Dendritic cell generation and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory t cells in human head and neck carcinoma during radio-chemotherapy. *Eur. J. Med. Res.*, 2011, 16: 57-62.

Wild, C. A., Brandau, S., Lindemann, M., Lotfi, R., Hoffmann, T. K., Lang, S. and Bergmann, C. Toll-like Receptors in Regulatory T Cells of Patients With Head and Neck Cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2010, 136: 1253-1259.

\* geteilte Autorenschaft

#### Vorträge

Pathogen recognizing receptor (PRR)-mediated crosstalk of tumor and immune cells, *Graduate School of Biomedical Science (BIOME)*, Universität Duisburg-Essen, Essen, 2012.

Human tumor-induced Treg and naturally occurring Treg differentially affect NK cells activated by interleukin-2 or target cells, *Symposium on Immune Recognition of Pathogens and Tumours (IRUN)*, Mülheim, 2011.

Induced regulatory T cells differentially affect NK cell activity in the tumor microenvironment. *Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)*, Leipzig, 2010.

Role of HMGB1 in Treg-mediated tumor immune escape. *Graduate School of Biomedical Science (BIOME)*, Universität Duisburg-Essen, Essen, 2010.

Interaction between regulatory T cells and dendritic cells via Toll-like receptors. *Autumn School of Immunology, DGfI*, Bad Schandau, 2009.

### Posterpräsentationen:

Human tumor-induced Treg and naturally occurring Treg differentially affect NK cells activated by interleukin-2 or target cells. *Forschungstag der medizinischen Fakultät des Univeristätsklinikums Essen*, Essen, 2011.

The endogenous danger signal HMGB1 promotes regulatory T cell function in healthy donors and patients with head and neck cancer. *Symposium on Immune Recognition of Pathogens and Tumours (IRUN)*, Mülheim, 2011.

Effect of Toll-like receptor agonists on tumor-immune cell cross-talk. *Jahrestagung Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft*, Innsbruck, 2011.

The Endogenous Danger Molecule High Mobility Group Box-1 Protein influences the Biology of Regulatory T cells.

- *Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)*, Leipzig, 2010.
- *Forschungstag der medizinischen Fakultät des Univeristätsklinikums Essen*, Essen, 2010.

Role of TLR-mediated signalling on regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Keystone Symposium "Immune Escape in Cancer"*, Keystone, CO, USA, 2010.

Rolle von TLR-vermittelten Signalen bei der Interaktion von dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. *Forschungstag der medizinischen Fakultät des Univeristätsklinikums Essen*, Essen, 2010.

### Beiträge der Ko-Autoren:

Autor	Beitrag
Bergmann, Christoph	Studienplanung, -organisation, Manuskripterstellung
Brandau, Sven	Studienplanung, -organisation, Manuskripterstellung
Fritz, Günter	Entwicklung studienspezifischer Antikörper
Hoffmann, Thomas	Probenbeschaffung
Lang, Stephan	Probenbeschaffung, Manuskripterstellung
Lindemann, Monika	Thymidinmessung
Lotfi, Ramin	Manuskripterstellung, Reagenzien
Mattheis, Stefan	Probenbeschaffung
Schuler, Patrick	Probenbeschaffung
Westendorf, Astrid	Zellsortierung
Xiang, Gu	RNA-Isolation, -Umschrift

## 11.2 Lebenslauf

---

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes in dieser Version nicht enthalten.

---



### 11.3 Eidestattliche Erklärung

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Endogene und therapeutische Liganden von Mustererkennungsrezeptoren bei der immunologischen Tumor-Wirt-Interaktion*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Clarissa Anni Wild* befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_ Prof. Dr. Sven Brandau \_\_\_\_\_  
Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/  
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Clarissa Wild

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Clarissa Wild